

NOTE TO USERS

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

CARACTÉRISATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES DE LA
CYCLOOXYGÉNASE ET DES RÉCEPTEURS AUX PROSTAGLANDINES
CHEZ LES OSTÉOCLASTES HUMAINS MATURES EN CULTURE.

Par

PATRICE SARRAZIN

Département de pharmacologie

Thèse présentée à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade

de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

Mai 2001



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-80548-4

Canada

Ce qu'on voulait faire, c'est en le faisant qu'on le découvre.

- Balzac

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES PUBLICATIONS.....	VI
PUBLICATIONS.....	VI
COMMUNICATIONS.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE D'ABRÉVIATIONS	XI
RÉSUMÉ.....	XIII
INTRODUCTION.....	1
1 PHYSIOLOGIE DE L'OS	1
1.1 <i>Morphologie</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Composition de l'os.....</i>	<i>2</i>
1.2.1 Minéraux	2
1.2.2 Matrice organique.....	3
1.2.3 Cellules de l'os	3
1.2.3.1 Les ostéoblastes	3
1.2.3.2 Les ostéocytes.....	4
1.2.3.3 Les ostéoclastes	5
1.2.3.3.1 L'ostéoclastogénèse.....	5
1.2.3.3.2 Le mécanisme de résorption.....	6
1.2.3.3.3 Régulation de l'activité ostéoclastique.....	11
1.2.3.3.4 Les autres cellules	13
1.3 <i>Modelage et remodelage</i>	<i>13</i>
1.4 <i>Homéostasie du calcium.....</i>	<i>15</i>
2 LES MALADIES OSSEUSES	16
2.1 <i>L'ostéoporose</i>	<i>17</i>
2.1.1 Définition.....	17
2.1.2 Épidémiologie	17
2.1.3 Pathophysiologie	18
2.1.4 Manifestations cliniques.....	19
2.1.5 Traitement	19
2.1.5.1 Calcium et vitamine D.....	19
2.1.5.2 Oestrogènes	19
2.1.5.3 Calcitonine.....	20
2.1.5.4 Biphosphonates	20

2.1.5.5	Calcitriol.....	21
2.1.5.6	Fluor	21
2.1.5.7	PTH	21
2.1.5.8	Strontium.....	21
2.2	<i>La maladie de Paget</i>	22
2.2.1	Définition.....	22
2.2.2	Épidémiologie	22
2.2.3	Pathophysiologie	22
2.2.4	Manifestations cliniques.....	23
2.2.5	Traitement	23
3	LES PROSTAGLANDINES.....	24
3.1	<i>Voie biosynthétique</i>	24
3.2	<i>Les cyclooxygénases</i>	27
3.3	<i>Les récepteurs</i>	28
3.3.1	Pharmacologie des récepteurs	29
3.3.1.1	Récepteur DP.....	29
3.3.1.2	Récepteur EP ₁	30
3.3.1.3	Récepteur EP ₂	31
3.3.1.4	Récepteur EP ₃	31
3.3.1.5	Récepteur EP ₄	32
3.3.1.6	Récepteur FP	32
3.3.1.7	Récepteur IP	33
3.3.1.8	Récepteur TP	33
3.3.2	L'effet des prostaglandines sur l'os.....	34
3.3.3	Les prostaglandines dans la résorption osseuse	35
3.3.4	Les prostaglandines dans la formation osseuse.....	36
3.3.5	Prostaglandines et autres modulateurs	37
3.3.6	Récepteurs impliqués	39
BUT	41
MATÉRIEL ET MÉTHODE	42
4	CULTURE CELLULAIRE.....	42
4.1	<i>Extraction des ostéoclastes</i>	42
4.2	<i>NIH-3T3</i>	43
5	EXPRESSION DE LA TRAP	43
6	COLORATION DES FILAMENTS DE F-ACTINE.....	44
7	DOSAGE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE	45
8	RÉSORPTION OSSEUSE	46
9	IMMUNOHISTOCHIMIE.....	47
9.1	<i>Détection des anticorps anti-récepteurs aux prostaglandines</i>	48
9.2	<i>Détection des anticorps anti-cyclooxygénases</i>	49
10	HYBRIDATION IN SITU	50
10.1	<i>Fixation</i>	50
10.2	<i>Digestion à la RNase</i>	50
10.3	<i>Marquage des sondes d'oligonucléotides</i>	50
10.4	<i>Hybridation</i>	52

10.5	Détection	53
11	ACTIVITÉ CYCLOOXYGÉNASE	54
RÉSULTATS		56
12	CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE	56
12.1	Expression de la phosphatase acide résistante au tartrate	56
12.2	Réponse à la calcitonine	60
12.3	Résorption	62
12.4	Formation des structures d'actine	65
13	EXPRESSION DES CYCLOOXYGÉNASES	69
13.1	Expression de l'ARNm des cyclooxygénases	69
13.2	Expression des protéines des cyclooxygénases	72
13.3	Activité cyclooxygénase	75
14	EXPRESSION DES RÉCEPTEURS AUX PROSTAGLANDINES	79
14.1	Expression des ARN messagers des récepteurs aux prostaglandines	79
14.2	Expression des protéines des récepteurs aux prostaglandines	82
15	EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES RÉCEPTEURS	85
DISCUSSION.....		94
REMERCIEMENTS.....		112
RÉFÉRENCES		113

LISTE DES PUBLICATIONS

PUBLICATIONS

SARRAZIN, P., FORTIER, I., de BRUM-FERNANDES, A.J. Expression of EP₃ and EP₄ Receptors on Human Mature Osteoclasts and Their Effect on Actin Organization. *En préparation*

SARRAZIN, P., FORTIER, I., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Cyclooxygenase Expression in Authentic Human Osteoclasts in Culture. Soumis au *Biochemistry*, Avril 2001.

SARRAZIN, P., BKAILY, G., HACHÉ, R., PATRY, C., DUMAIS, R., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Characterization of prostaglandins receptors in human osteoblasts in culture. *Prostaglandins, Leukotriene and Essentials Fatty Acids*, 2001; 64:203-210.

MACIEL, F., LORA, M., MORRISSET, S., PATRY, C., SARRAZIN, P., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Parathyroid Hormone Induction of Cyclooxygenase-2 Expression in Human Osteoblasts Depends on both cAMP and Calcium-Dependent Pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1998;433:303-306.

MACIEL, F., SARRAZIN, P., MORRISSET, S., LORA, M., DUMAIS, R., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Induction of Cyclooxygenase-2 by Parathyroid Hormone in Human Osteoblasts in Culture. *Journal of Rheumatology*, 1997;12:2429-2435.

COMMUNICATIONS

SARRAZIN, P., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Caractérisation de l'expression des isoenzymes de la cyclooxygénase et des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes humains matures. Club de Recherche Clinique du Québec, 42^{ième} Conférence annuelle, Québec. Septembre 2000. *Médecine Sciences* (2000), 16(suppl 2):33.

MIOUSSE, M.C., SARRAZIN, P., PATRY, C., FORTIER, I., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Expression des récepteurs aux prostaglandines chez les MG-63 et SaOS-2. Club de Recherche Clinique du Québec, 42^{ième} Conférence annuelle. Bromont, Québec. Septembre 2000. *Médecine Sciences* (2000), 16(suppl 2):30.

LORA, M., SARRAZIN, P., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Implication des cyclooxygénases et des prostaglandines dans l'ostéoclastogénèse humaine *in vitro*. Club de Recherche Clinique du Québec, 42^{ième} Conférence annuelle. Bromont, Québec. Septembre 2000. *Médecine Sciences* (2000), 16(suppl 2):38.

SARRAZIN, P., FORTIER, I., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Cyclooxygenase expression in authentic human osteoclasts. American Society for Bone and Mineral Research, 32^{ième} Conférence annuelle. Toronto, Ontario. Novembre 2000. *Journal of bone and Mineral research* (2000), 15(suppl 1):S395.

SARRAZIN, P., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Caractérisation des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes matures humains. 28^e Édition de la Journée Scientifique de l'Université de Sherbrooke. Sherbrooke, Québec. Mai 1999.

SARRAZIN, P., PATRY, C., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Difference of Expression Among Osteoblastic Cell Lines. Fifth Canadian Connective Tissue Conference. Montréal, Québec. Juin 1999.

SARRAZIN, P., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Isolation of Mature Human Osteoclasts and Characterization of Cyclooxygenase Isoforms Expression. Fifth Canadian Connective Tissue Conference. Montréal, Québec. Juin 1999.

SARRAZIN P, DE BRUM-FERNANDES AJ. Isolation of Mature Human Osteoclasts and Characterization of Cyclooxygenase Isoforms Expression. American Society for Bone and Mineral Research et the International Bone and Mineral Society. 2^{ième} Conférence conjointe, San Francisco, Californie. Décembre 1998. *Bone* (1998), 23(5 suppl.):S338

SARRAZIN, P., PATRY, C., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Characterization of prostaglandins receptors in human osteoblasts in culture. XII Panamerican

Congress of Rheumatology. Montréal, Québec. Juin 1998. *Journal of Rheumatology* (1998), 25(suppl. 52):M102

SARRAZIN, P., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Authentic Human Osteoclasts Obtained from Fetal Tissue. XII Panamerican Congress of Rheumatology, Montréal, Québec. Juin 1998. *Journal of Rheumatology* (1998), 25(suppl. 52):T96

SARRAZIN, P., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Isolation of Mature Human Osteoclasts. Fourth Canadian Connective Tissue Conference. London, Ontario. Juin 1998.

SARRAZIN, P., PATRY, C., DE BRUM-FERNANDES, A.J. Characterization of prostaglandins receptors in human osteoblasts in culture. Third Canadian Connective Tissue Conference. Kingston, Ontario. Mai 1997.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Voie de synthèse des prostanoïdes.....	26
Figure 2. Expression de la phosphatase acide résistante au tartrate.....	58
Figure 3. Nombres de cellules TRAP positives selon l'âge foetal.....	59
Figure 4. Effet de la calcitonine sur le niveau de calcium intracellulaire	61
Figure 5. Résorption osseuse sur disque d'os bovins.....	63
Figure 6. Effet de la calcitonine sur l'activité de résorption	64
Figure 7. Présence d'un anneau d'actine chez une cellule multinucléée TRAP+	66
Figure 8. Présence de lamellipodes chez les ostéoclastes	67
Figure 9. Présence de podosomes chez les ostéoclastes en culture.....	68
Figure 10. Hybridation in situ montrant l'expression de l'ARNm de la COX-1	70
Figure 11. Hybridation in situ montrant l'expression de l'ARNm de la COX-2	71
Figure 12. Immunohistochimie montrant l'expression de la COX-1	73
Figure 13. Immunohistochimie montrant l'expression de la COX-2	74
Figure 14. Activité cyclooxygénase chez les NIH-3T3.	77
Figure 15. Activité cyclooxygénase chez les ostéoclastes	78
Figure 16. Hybridation in situ montrant l'ARN messager du récepteur EP ₃	80
Figure 17. Hybridation in situ montrant l'ARN messager du récepteur EP ₄	81
Figure 18. Immunohistochimie dirigée contre le récepteur EP ₃	83
Figure 19. Immunohistochimie dirigé contre le récepteur EP ₄	84
Figure 20. Formation des anneaux d'actine dans le temps.....	88
Figure 21. Détermination du temps de stimulation optimal.....	89
Figure 22. Effet de la PGE ₂ sur les structures d'actine	90
Figure 23. Effet de la 11-déoxy-PGE ₁ sur structure d'actine	91
Figure 24. Effet du Butaprost sur structures d'actine	92
Figure 25. Effet du misoprostol sur structure d'actine.....	93

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Protéines G et seconds messagers	34
Tableau 2 Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie	49
Tableau 3. Séquences des oligonucléotides utilisés lors de l'hybridation <i>in situ</i> ...	52

LISTE D'ABRÉVIATIONS

AINS	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens
ATCC	American Tissue Culture Collection
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BSA	Bovine Serum Albumine
COX-1	Cyclooxygénase-1
COX-2	Cyclooxygénase-2
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DIG	Digoxigénine
DMEM	Dulbco Minimum Essential Media
FBS	Fetal Bovine Serum
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
H ₂ DCFDA	dichlorodihydrofluorescéine diacétate carboxylée
IFN γ	interféron γ
IGF II	Insulin-like Growth Factor II
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor
MEM	Minimal Essential Media
MMP	matrix metalloproteinases
NBT	nitroblue tetrazolium
ODF	osteoclast-differentiating factor
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

OPG	osteoprotegerin
OPGL	osteoprotegerin ligand
PBS	Phosphate Buffer Saline
PG	Prostaglandines
PGHS	Prostaglandine H ₂ Synthase
PTH	parathormone
RANK	receptor for activation of nuclear factor kappa B
RANKL	receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand
SSC	Sodium Citrate
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TRANCE	Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase

RÉSUMÉ

Université de Sherbrooke

CARACTÉRISATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES DE LA CYCLOOXYGÉNASE ET DES RÉCEPTEURS AUX PROSTAGLANDINES CHEZ LES OSTÉOCLASTES HUMAINS MATURES EN CULTURE.

Patrice Sarrazin

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Pharmacologie
mai 2001

Les prostaglandines sont d'importants médiateurs dans le métabolisme osseux. Elles ont des effets directs et indirects sur les cellules osseuses et ces effets peuvent différer d'une espèce à l'autre. Nous avons utilisé un modèle *ex vivo* pour démontrer la présence des cyclooxygénases et des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes matures humains. Les ostéoclastes ont été extraits à partir de fœtus humains entre 14 et 20 semaines de gestation. Ces cellules étaient multinucléées, TRAP positives, sensibles à la calcitonine et étaient capables de résorber l'os. Nous avons montré, en utilisant des sondes oligonucléotidiques marquées à la digoxigénine en hybridation *in situ*, la présence de l'ARNm de la cyclooxygénase-1 et 2 (COX-1 et COX-2) ainsi que les ARNm des récepteurs EP₃ et EP₄. La présence des COXs et des récepteurs a été confirmée par immunohistochimie. La COX-1 se retrouvait exprimée au cytoplasme tandis que la COX-2 se trouvait à la périphérie des noyaux. À l'aide d'une sonde fluorescente (H₂DCFDA) et d'anti-inflammatoires, une activité cyclooxygénase élevée a été démontrée chez les ostéoclastes matures fœtaux. La localisation du récepteur EP₃ était majoritairement membranaire tandis que le récepteur EP₄ était nucléaire. Les études fonctionnelles ont permis d'observer que le récepteur EP₃ était responsable de la diminution des lamellipodes, suggérant une implication de ce récepteur dans la régulation de la motilité des ostéoclastes. L'activation du récepteur EP₄ avait pour effet de diminuer la formation de l'anneau d'actine, suggérant donc que le récepteur EP₄ était impliqué dans la régulation de la résorption osseuse.

INTRODUCTION

1 *PHYSIOLOGIE DE L'OS*

1.1 Morphologie

La structure de l'os peut être divisée en deux parties, une partie extérieure appelée os cortical ou compact et une partie interne nommée os trabéculaire ou spongieux. Les os sont formés d'une enveloppe externe d'os cortical et d'un réseau interne tridimensionnel d'os trabéculaire, ce qui leur confèrent des fonctions mécaniques optimales. En microscopie, on peut distinguer deux types d'organisation du tissu osseux. L'os enchevêtré est le type d'os formé initialement lors de l'embryogenèse et de la croissance. Il est caractérisé par une couche irrégulière de fibrilles de collagène enchevêtrées. Lors de la croissance ou de la réparation, ce type d'os est remplacé par l'os lamellaire. L'os enchevêtré est pratiquement absent du squelette adulte, excepté lors de conditions pathologiques telles que la maladie de Paget et la réparation de fractures où l'on retrouve une formation osseuse accélérée. L'os lamellaire est composé d'une structure bien ordonnée de fibres de collagène alignées de façon parallèle. Chez l'adulte, l'os cortical et l'os trabéculaire sont normalement composés d'os lamellaire.

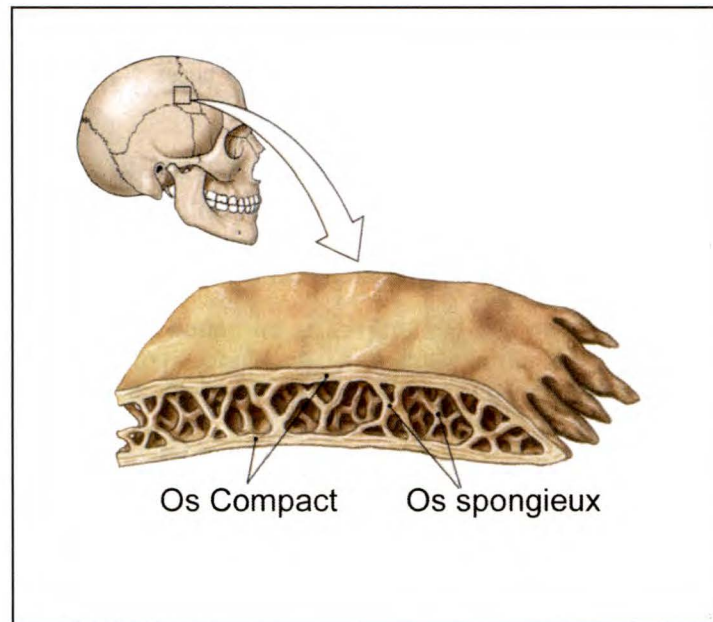


Figure 1. Structure de l'os

1.2 Composition de l'os

L'os est composé de minéraux, de matrice organique, de cellules et d'eau.

1.2.1 Minéraux

Les minéraux composent près des deux tiers du poids sec total de la masse osseuse. L'hydroxyapatite est la principale forme de minéraux que l'on retrouve dans l'os. Cependant, on retrouve aussi en plus petite quantité d'autres constituants tel que le phosphate, le carbonate, le citrate, le magnésium, le sodium, le fluor et le strontium. Les petits cristaux de forme aplatie se logent à l'intérieur et entre les fibrilles de collagène, ce qui confère à l'os sa rigidité et sa force. Le processus de minéralisation peut être régulé par plusieurs activateurs et inhibiteurs.

1.2.2 Matrice organique

La matrice organique représente 35 % du poids sec de l'os. Le collagène est la protéine la plus abondante de la matrice organique et compose 90 % de celle-ci. La structure tridimensionnelle complexe de la matrice organique est comparable à celle d'un câble, ce qui donne la force de tension à l'os.

Les autres constituants de la matrice sont des protéines non-collagénueuses dont les fonctions sont encore très peu connues. Parmi ces protéines on retrouve l'ostéonectine, l'ostéocalcine, l'ostéopontine et la sialoprotéine. La plupart de ces protéines sont synthétisées et déposées exclusivement au niveau de l'os, ce qui en fait des outils très intéressants en clinique. L'excrétion via l'urine ou le taux plasmatique de ces protéines nous indiquent le taux de remaniement osseux.

La matrice organique contient aussi une importante quantité de différents facteurs de croissance, particulièrement de TGF- β et d'IGF II. On suppose que ces facteurs jouent un rôle dans la modulation du remaniement osseux lorsqu'ils sont relâchés au cours de la résorption osseuse.

1.2.3 Cellules de l'os

1.2.3.1 Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la synthèse de l'os. Elles dérivent des cellules souches mésenchymales et forment, à la surface de l'os, une structure semblable à l'épithélium. La fonction primaire des ostéoblastes est de synthétiser l'ostéoïde. L'ostéoïde est la matrice non calcifiée qui contient les

différentes protéines retrouvées dans l'os. Une fois sécrétée, l'ostéoïde subira une étape de minéralisation qui la transformera en matrice osseuse. En plus d'être responsable de la sécrétion d'ostéoïde, les ostéoblastes jouent un rôle important dans la minéralisation. La phosphatase alcaline membranaire est fortement exprimée chez les ostéoblastes et elle est reconnue pour jouer un rôle essentiel dans le processus de minéralisation.

1.2.3.2 Les ostéocytes

A un certain moment, les ostéoblastes cessent de produire la matrice et deviennent inclus dans l'os. Les ostéoblastes qui se retrouvent pris au piège dans la matrice osseuse perdent une partie de leurs organelles et se transforment en ostéocytes. Malgré le fait que les ostéocytes constituent le type cellulaire le plus nombreux de l'os, leurs rôles sont jusqu'à maintenant encore très mal connus. Grâce à leurs projections cellulaires qui relient non seulement les ostéocytes entre eux mais aussi aux ostéoblastes de la surface, les ostéocytes forment un vaste réseau de communication intercellulaire. En plus de permettre le transport des nutriments vers les cellules qui se retrouvent dans l'os, ce réseau augmente de beaucoup l'aire d'exposition de l'os aux fluides. Cela nous amène à penser que les ostéocytes pourraient jouer un rôle dans l'homéostasie du calcium. De plus, beaucoup d'évidences tendent à montrer que les ostéocytes sont impliqués dans la réponse aux tensions mécaniques subies par l'os (Burger *et al*, 1995).

1.2.3.3 Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées formées par la fusion des cellules progénitrices mononucléaires de la famille des monocytes/macrophage. Ce sont les principales, sinon les seules, cellules responsables de la résorption osseuse. Les ostéoclastes jouent donc un rôle central dans la formation et la régulation de la formation du tissu osseux.

1.2.3.3.1 L'ostéoclastogénèse

Il a été démontré en 1990 que la différenciation *in vitro* des macrophages en ostéoclastes nécessitait la présence de cellules stromales de la moelle ou de leurs dérivés ostéoblastiques (Udagawa *et al*, 1990). Après une décennie de confusion, il est maintenant clair que ces cellules accessoires expriment deux molécules qui sont à la fois suffisantes et nécessaires pour promouvoir l'ostéoclastogénèse : le M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) et le *RANKL* (receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand) qui est aussi connu sous les noms de ODF (osteoclast-differentiating factor), OPGL (osteoprotegerin ligand) ou TRANCE (Tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine).

Le M-CSF se lie à son récepteur, c-FMS, exprimé chez les précurseurs ostéoclastiques et ainsi leur donne le signal requis pour leur survie et leur prolifération (Udagawa *et al*, 1990). Même si le M-CSF est une molécule sécrétée, l'ostéoclastogénèse exige un contact cellule-cellule entre les précurseurs ostéoclastiques et les cellules stromales ou ostéoblastiques (Udagawa *et al*, 1990).

Donc, les cellules accessoires doivent exprimer une molécule de surface dont l'identité est demeurée longtemps énigmatique. Il a été démontré que l'administration de l'ostéoprotégérine (OPG) bloquait l'ostéoclastogénèse et que les souris qui n'exprimaient pas l'OPG démontraient une ostéoclastogénèse accélérée et développaient une ostéoporose sévère (Simonet *et al*, 1997). L'ostéoprotégérine est maintenant connue comme étant un récepteur de clairance soluble qui est capable de se lier au *RANKL* et ainsi l'empêche de se lier à son récepteur présent chez les ostéoclastes, le *RANK* (receptor for activation of nuclear factor kappa B) (Lacey *et al*, 1998). La présence du *RANK* chez les ostéoclastes et ses précurseurs suggère que le facteur de différenciation ostéoclastique présent chez les cellules accessoires pourrait être le *RANKL*, ce qui a été prouvé comme étant vrai (Lacey *et al*, 1998).

Le M-CSF permet la prolifération des précurseurs ostéoclastiques et le *RANKL* leur permet de franchir l'étape finale de différenciation. Ainsi, l'ostéoclastogénèse peut donc être régulée à la hausse avec le *RANKL* ou à la baisse avec l'OPG.

1.2.3.3.2 Le mécanisme de résorption

Lorsqu'ils ont atteint la maturité, les ostéoclastes sont capables d'effectuer la résorption de l'os. La résorption osseuse est un processus qui comprend plusieurs étapes.

Migration

Avant que les ostéoclastes soient en mesure de remplir leur rôle physiologique de résorption osseuse, ils doivent migrer au site de résorption. Les ostéoclastes sont des cellules très motiles et ceci est dû aux remaniements rapides des fibres d'actine au niveau de leur cytosquelette (Kanehisa *et al*, 1988). Le déplacement des ostéoclastes implique la reconnaissance des composantes de la matrice osseuse et l'attachement à l'os via une interaction ligand-récepteur (Oldberg *et al*, 1986). L'interaction entre les ostéoclastes et la matrice osseuse est faite par les intégrines. Les ostéoclastes humains expriment au moins trois types d'intégrines : $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$ (Nesbitt *et al*, 1993; Hughes *et al*, 1993). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ semble la plus abondante chez les ostéoclastes et elle capable de reconnaître spécifiquement la séquence d'acides aminés Arg-Gly-Asp (RGD). Les ostéoclastes sont donc capables de s'attacher à l'os et de migrer sur la matrice osseuse via l'interaction de leurs intégrines et des protéines de la matrice contenant le motif RGD telles que l'ostéopontine et la bone sialoprotein II (Oldberg *et al*, 1986).

Attachement

Suite à la migration au site de résorption, l'étape initiale de la résorption est l'attachement des ostéoclastes à la matrice osseuse. Une fois attachés à l'os, les ostéoclastes actifs montrent une organisation du cytoplasme hautement polarisée. La membrane plasmique forme alors deux domaines distincts : un domaine basolatéral qui fait face à la circulation vasculaire et un domaine apical qui fait

face à la matrice osseuse. Les noyaux et les organelles sont distribués du côté de la membrane basolatérale alors que les lysosomes sont majoritairement concentrés du côté de la membrane apicale où les enzymes nécessaires à la résorption seront sécrétés à l'extérieur de la cellule.

Les structures responsables de l'attachement des ostéoclastes à la matrice osseuse sont appelées les podosomes. Les podosomes sont des prolongements de la membrane plasmique (Chellaiah *et al*, 2000) qui sont composés de protéines telles que l'actine, la vinculine, la taline, la α -actinine et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (Teti *et al*, 1991). Lors de la polarisation de la cellule, les podosomes sont redistribués en périphérie de la membrane apicale et forment la membrane étanche. La membrane étanche forme alors un anneau qui délimite un espace étanche sous la cellule appelé la poche de résorption dans laquelle l'ostéoclaste produira les conditions requises pour la résorption osseuse via la membrane plissée. La membrane plissée est la partie de la membrane apicale qui se retrouve à l'intérieur de la poche de résorption (Silver *et al*, 1988); elle est formée d'une multitude de repliements et représente la structure responsable de la résorption. Il a été démontré que la présence de l'anneau d'actine formé par la distribution des podosomes et de la membrane plissée est nécessaire pour qu'il y ait résorption (Vaananen *et al*, 1995).

Acidification

L'os est majoritairement constitué de collagène de type I (>90%) et de protéines non-collagéniques qui sont enrobées dans une phase minérale,

l'hydroxyapatite. La dissolution de la phase minérale précède la digestion de la matrice organique (Blair *et al*, 1986). La déminéralisation de la matrice implique une acidification de l'espace extracellulaire de la poche de résorption. Ceci est accompli en partie par les pompes à proton H^+ -ATPase présentes au niveau de la membrane plissée de l'ostéoclaste (Blair *et al*, 1989; Mattsson *et al*, 1994). Pour préserver le balancement des charges, des canaux chloridriques, associés à la membrane plissée, agissent de concert avec les pompes H^+ -ATPase (Schlesinger *et al*, 1997), ce qui provoque la sécrétion de HCl dans la poche de résorption dans laquelle on retrouve un pH d'environ 4.5 (Silver *et al*, 1988).

Dégradation de la matrice

Les données disponibles présentement ne permettent pas d'établir de façon définitive l'identité et la séquence d'actions enzymatiques lors de la digestion de la partie organique de la matrice osseuse. Cependant, il a été démontré que plusieurs enzymes étaient exprimées chez les ostéoclastes. Parmi les enzymes les plus récemment identifiées on retrouve la métalloprotéinase 9 (MMP-9/gélatinase B/EC 3.4.24.35), la métalloprotéinase 1 membranaire (MT1-MMP/MMP-14/EC 3.4.24.43) et la cathepsin K (EC 3.4.22.38) (Werb, 1997). Ces enzymes semblent avoir un rôle important dans la résorption osseuse.

Les MMPs (matrix metalloproteinases) font partie d'une famille d'endopeptidases qui dégradent les composantes de la matrice extracellulaire. Elles sont essentielles pour la formation, le maintien et le remodelage de plusieurs

tissus en régularisant le recyclage de la matrice extracellulaire. Parmi les substrats connus pour les MMPs, on retrouve les collagènes type I, IV et VII que l'on retrouve dans la composition de l'os. La MT1-MMP est la protéinase associée à la membrane qui est fortement exprimée par les ostéoclastes; elle semble être localisée dans les régions membranaires correspondant aux podosomes et aux lamellipodes (Sato *et al*, 1997), ce qui suggère que la fonction des MMPs ne semble pas se limiter à la résorption osseuse mais pourrait aussi jouer un rôle dans la migration et l'attachement des ostéoclastes (Blavier *et al*, 1995).

La cathepsine K appartient à la famille des cystéines protéinases qui inclut aussi les cathepsines B, H, L, C, S. Plusieurs cathepsines sont exprimées par les ostéoclastes mais la cathepsine K est celle retrouvée en plus grande quantité (Inaoka *et al*, 1995). La cathepsine K est activée à un pH de 4 et parmi ces substrats, on retrouve deux protéines majeurs de la matrice osseuse : le collagène et l'ostéonectine (Bossard *et al*, 1996). La cathepsine K joue un rôle majeur dans la résorption osseuse et elle est devenue une cible populaire dans le but de réduire la résorption osseuse par les ostéoclastes.

Enlèvement des produits dégradés

La façon dont les ostéoclastes retirent les produits dégradés de la poche de résorption a longtemps été débattue. Les opinions étaient partagées entre trois hypothèses. La première hypothèse voulait que l'ostéoclaste se détache et se ré-attache pour permettre le relâchement des produits de dégradation. La deuxième

suggérerait qu'il y ait un mouvement de calcium à travers le cytoplasme via des pompes ioniques. Finalement, la troisième hypothèse suggérerait une transcytose via des vésicules. Avec le développement des techniques permettant l'observation directe du transport des composants de l'os marqués, il a été clairement démontré que le phénomène de transcytose vésiculaire est un processus important lors de la résorption osseuse (Nesbitt *et al*, 1997; Salo *et al*, 1997).

1.2.3.3.3 Régulation de l'activité ostéoclastique

Même si certains mécanismes fonctionnels des ostéoclastes ne sont pas encore très bien documentés, les mécanismes de base sont très bien compris. Cependant, les mécanismes qui régularisent le remaniement osseux sont beaucoup moins bien connus. Les ostéoclastes sont impliqués dans le développement et la croissance de l'os, le remodelage osseux normal, la réponse aux forces mécaniques, l'homéostasie des électrolytes et dans la réparation des os. Il apparaît donc évident que plusieurs voies de régulation contrôlent la différenciation et l'activité des cellules matures.

La résorption osseuse peut être modulée en jouant sur trois processus de base : le recrutement de nouveaux ostéoclastes, la durée de vie des ostéoclastes et l'activité des ostéoclastes matures. Les trois processus peuvent être influencés par toute une série de cytokines et d'hormones. Des études récentes indiquent que les trois processus semblent être sous le contrôle des ostéoblastes qui synthétisent les

facteurs qui sont en mesure d'influencer directement les ostéoclastes et leurs précurseurs (Sato *et al*, 1997;Tsukii *et al*, 1998;Li *et al*, 2000).

Les trois principales hormones impliquées dans la modulation de la résorption osseuse sont la parathormone (PTH), la 1,25-dihydroxy-vitamine D et la calcitonine, les deux premières augmentant la résorption osseuse et la dernière la diminuant (Mazzuoli *et al*, 1986;Takeda *et al*, 1999;Li *et al*, 2000). De plus, l'estrogène chez la femme et la testostérone chez l'homme inhibent la résorption osseuse. C'est pourquoi, suite à la ménopause et l'ovariectomie, la résorption osseuse augmente.

Parmi les cytokines les plus importantes capables d'augmenter la résorption osseuse *in vitro*, on retrouve les interleukines 1, 3, 6 et 11(Rifas, 1999), le tumor necrosis factor α et β (TNF α et TNF β), le macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), le granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et les prostaglandines (Fujikawa *et al*, 2001). L'interféron γ (IFN γ), le TGF β , l'interleukine-4 et 13 ainsi que les antagonistes du récepteur à l'interleukine-1 sont capables de diminuer la résorption osseuse (Mundy, 1993;Kamolmatyakul *et al*, 2001).

Récemment, un nouveau facteur capable d'inhiber la formation et l'activité des ostéoclastes a été découvert : il s'agit de l'ostéoprotégérine (OPG), une glycoprotéine soluble de la superfamille des TNF qui est produite par les cellules stromales et les lignées ostéoblastiques (Aubin *et al*, 2000). L'OPG agit comme récepteur de clairance, se liant au facteur de différenciation ostéoclastique appelé *RANK ligand* (*RANKL*) ou osteoclast differentiation factor (ODF). Le *RANKL* est

localisé sur la membrane des cellules ostéoblastiques. En se liant au *RANKL*, l'OPG inhibe la liaison entre le *RANKL* avec son récepteur trans-membranaire, le *RANK*. Le *RANK* se trouve sur les ostéoclastes et ses précurseurs et augmente la différenciation et l'activité de ces cellules. En empêchant la liaison du *RANKL* avec le *RANK*, l'OPG inhibe le recrutement de nouveaux ostéoclastes et l'activation des ostéoclastes matures. La synthèse de l'OPG et du *RANKL* par les ostéoblastes est modulée par les hormones et les cytokines qui affectent la résorption osseuse. Il semble de plus en plus évident que ces facteurs jouent un rôle majeur dans la régulation de la résorption osseuse faite par les ostéoclastes.

1.2.3.3.4 Les autres cellules

La moelle osseuse contient aussi d'autres cellules, parmi lesquelles les cellules hématopoïétiques, les cellules du système immunitaire et les cellules stromales. Ces cellules sont non seulement importantes pour la formation des ostéoclastes mais semblent interagir avec les autres cellules de l'os via différentes cytokines. Elles semblent aussi être impliquées au niveau de la formation et de la résorption osseuse.

1.3 Modelage et remodelage

L'os est construit durant la vie fœtale, l'enfance et l'adolescence par deux mécanismes fondamentaux : l'ossification endochondrale où l'os est construit sur

une charpente cartilagineuse, et l'ossification intramembraneuse où l'os est construit directement, sans charpente, à partir de la matrice mésenchymateuse. L'élaboration de la forme définitive du squelette est sous le contrôle de nombreux gènes qui sont de mieux en mieux connus.

Une fois formé, la forme et la structure de l'os sont continuellement renouvelées par deux processus, le modelage et le remodelage. Lors du modelage qui arrive principalement lors de la croissance, la matrice osseuse nouvellement synthétisée est déposée à un endroit différent du site de résorption. Ce processus amène ainsi des changements dans la forme du squelette. Le modelage est le principal processus qui permet au squelette d'accroître son volume et sa masse. Dans le remodelage, qui est le processus le plus actif chez l'adulte, la formation et la résorption osseuse sont couplées dans l'espace et le temps. Ce couplage est fait en sorte qu'il n'y ait aucun changement majeur dans la masse osseuse totale tout en permettant à l'os d'adapter sa structure aux changements de tension mécanique.

Le modelage et le remodelage sont deux processus qui permettent le remplacement du vieux tissu osseux par du nouveau. Ces phénomènes permettent au squelette de conserver ses propriétés mécaniques et physiques. Un déséquilibre entre la résorption et la formation osseuse provoque des maladies osseuses telles que l'ostéoporose et la maladie de Paget, qui seront vues en détail un peu plus loin. De plus, le squelette étant un excellent réservoir d'ions, le remaniement osseux permet l'utilisation ou l'entreposage des différents ions.

1.4 Homéostasie du calcium

La concentration du calcium dans le plasma est d'environ 10 mg par 100 ml. Quarante pour cent de cette quantité sont liés aux protéines et 10 % aux autres ions. Ainsi, seulement 50 % du calcium se retrouve sous la forme ionisée. Le niveau de calcium plasmatique ionisé est très étroitement régularisé dans tout le règne animal. L'étroite régulation est expliquée par l'importance du calcium extracellulaire dans de nombreux processus biologiques. Le niveau de calcium plasmatique est maintenu par trois organes cibles: les intestins, les os et les reins. Au niveau de l'os, il existe deux processus qui permettent de faire varier les niveaux de calcium plasmatique : la résorption osseuse et l'équilibre acido-basique du plasma. La variation du pH peut favoriser la dissolution ou la déposition des minéraux de l'os. L'importance de la résorption osseuse versus l'équilibre des cristaux d'hydroxyapatite à la surface de l'os reste encore controversée. Cependant, l'équilibre des cristaux semble jouer un rôle plus important dans la régulation à court terme.

Les flux de calcium sont contrôlés principalement par trois hormones : la parathormone (PTH), la 1,25-dihydroxy-vitamine D₃ (calcitriol) et la calcitonine. Ces trois hormones régularisent le niveau de calcium plasmatique via des mécanismes de rétroaction. Parmi ces trois hormones, la PTH est la plus importante. Elle augmente le niveau de calcium plasmatique en agissant sur les trois organes cibles. Elle active la résorption osseuse, accroît l'absorption du

calcium au niveau des intestins et sa réabsorption au niveau des reins. La production de PTH est inversement proportionnelle au niveau de calcium plasmatique et constitue un mécanisme de rétroaction rapide.

La 1,25-dihydroxy-vitamine D₃ augmente l'absorption intestinale du calcium et augmente l'effet de la PTH qui accroît la réabsorption rénale du calcium. Sa production est aussi stimulée par une faible concentration de calcium plasmatique. Contrairement à la PTH qui agit en quelques minutes, la 1,25-dihydroxy-vitamine D₃ requiert plusieurs heures. Par ailleurs, les métabolites de la vitamine D sont aussi importants dans le processus de la minéralisation.

Finalement, la calcitonine inhibe la destruction de l'os. Sa production est rapidement régulisée par un mécanisme de rétroaction positif selon la concentration de calcium plasmatique. Sa synthèse est activée par une concentration élevée de calcium. Cependant, son implication chez l'humain au niveau de l'homéostasie du calcium n'est pas encore très bien établie.

2 LES MALADIES OSSEUSES

Il existe plusieurs affections qui peuvent toucher le système osseux. Nous porterons notre attention ici sur deux des maladies osseuses métaboliques les plus communes, soit l'ostéoporose et la maladie de Paget.

2.1 L'ostéoporose

2.1.1 Définition

L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une diminution de la masse osseuse et par une détérioration de l'architecture de l'os. Ces phénomènes mènent à une augmentation de la fragilité de l'os et du même coup augmente les risques de fractures. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a quantifié la définition d'ostéoporose chez la femme. Ainsi, l'ostéoporose est définie comme étant présente chez une femme qui possède une densité osseuse de 2.5 déviations standards inférieure à la moyenne du groupe référence de jeune adulte.

2.1.2 Épidémiologie

L'ostéoporose est une maladie qui devient de plus en plus commune due l'augmentation de l'espérance de vie. L'incidence de la maladie est beaucoup plus élevée chez la femme que chez l'homme de même que chez les blancs et les Asiatiques comparativement aux noirs. Il est estimé que près d'une femme sur deux ayant atteint l'âge de 50 ans subira une fracture ostéoporotique au cours du restant de sa vie. Dû à son impact médical et socio-économique, l'ostéoporose est un problème de santé publique majeur qui prend de plus en plus d'importance à cause du vieillissement de la population. Le développement d'approches préventives et thérapeutiques contre l'ostéoporose est donc d'une importance capitale pour le futur.

2.1.3 Pathophysiologie

Durant leur vie, les femmes perdent en moyenne de 30 à 40 % de leur masse osseuse maximale comparativement à de 20 à 30 % chez les hommes. Chez les femmes après la ménopause, les trabécules deviennent plus minces, discontinues et peuvent même disparaître. Ceci mène à une détérioration de la micro-architecture de l'os et le rend plus fragile.

La perte osseuse se produit de deux façons distinctes. La première est une perte continue qui est dépendante de l'âge. Cette perte débute aux alentours de 50 ans et s'effectue à un rythme de 0.5 à 1 % par année autant chez l'homme que chez la femme. Chez les femmes, on retrouve une deuxième forme de perte osseuse qui survient suite à la ménopause. Cette perte, due à la diminution d'œstrogène, s'effectue au rythme de quelques points de pourcentage par année et dure en moyenne de 5 à 8 ans. Après un certain temps, la densité osseuse atteindra une valeur où les structures de l'os deviendront fragiles et où le risque de fractures sera élevé. Les mécanismes menant à la perte osseuse ne sont pas encore parfaitement compris. Cependant, il est clair qu'après la ménopause, la perte osseuse est due à une augmentation de la résorption osseuse qui est provoquée par la perte des oestrogènes. Cette augmentation de résorption osseuse faite par les ostéoclastes couplés à la diminution de la production osseuse effectuée par les ostéoblastes a pour effet d'engendrer une perte de la masse osseuse.

2.1.4 Manifestations cliniques

Les signes cliniques de l'ostéoporose sont les fractures et leurs conséquences. Les fractures surviennent spontanément ou après un léger traumatisme. Les fractures surviennent d'abord au niveau de l'avant-bras et de la colonne vertébrale, plus tard au niveau des hanches. Les multiples fractures par tassement des vertèbres entraînent une déviation de la colonne appelée cyphose. La cyphose est associée à une diminution de la taille chez certaines femmes ménopausées.

2.1.5 Traitement

Le traitement de l'ostéoporose comporte deux objectifs : l'inhibition de la résorption osseuse et, idéalement, la reconstruction de la masse osseuse. Malgré le fait qu'il existe aujourd'hui des approches thérapeutiques qui limitent les dommages causés par l'ostéoporose, aucune de ces approches n'est en mesure de rétablir parfaitement la densité osseuse des patients.

2.1.5.1 Calcium et vitamine D

Dans le traitement comme dans la prévention, on doit assurer un apport suffisant en calcium. Puisque les personnes âgées absorbent moins bien le calcium, il faut ajouter un apport en vitamine D pour faciliter son absorption (Chapuy *et al*, 1987).

2.1.5.2 Oestrogènes

Les oestrogènes peuvent augmenter la masse osseuse vertébrale de 5 % et réduire de moitié le taux de fractures à ce niveau (Lindsay *et al*, 1990). Ils

entraînent cependant un risque augmenté de cancer de l'endomètre et de cancer du sein. Il existe une nouvelle classe de composés appelés les modulateurs sélectifs des récepteurs aux oestrogènes (SERM). Les composés les plus étudiés de cette classe sont le rolaxifène et le tamoxifène. Comme les oestrogènes, ces composés possèdent des effets protecteurs contre la résorption osseuse chez les femmes ménopausées. Par contre, contrairement aux oestrogènes, ces composés n'augmentent pas le risque de cancer du sein ni de l'endomètre (Agnusdei *et al*, 1999).

2.1.5.3 *Calcitonine*

La calcitonine peut être utile pour freiner la perte osseuse trabéculaire (Mazzuoli *et al*, 1986), mais son effet sur le taux de fracture et la protection de l'os cortical a été mis en doute. La calcitonine comporte aussi des propriétés analgésiques, ce qui lui confère un rôle dans le traitement des douleurs induites par l'écrasement vertébral ostéoporotique. Cependant, son utilisation est limitée par le phénomène d'échappement retrouvé chez certains patients. Le phénomène d'échappement se manifeste par une perte d'efficacité du traitement.

2.1.5.4 *Biphosphonates*

Les biphosphonates exercent une action régulatrice sur le métabolisme osseux. Ils ont une forte affinité pour les cristaux d'hydroxyapatite des os où ils s'accumulent. Une fois adsorbés au niveau de l'os, ils induisent des changements morphologiques chez les ostéoclastes. Ils réduisent l'activité et le recrutement des ostéoclastes favorisant ainsi la formation osseuse (Fitton *et al*, 1991).

2.1.5.5 *Calcitriol*

Le calcitriol est un métabolite actif de la vitamine D qui facilite l'absorption du calcium et qui favorise probablement l'activité des ostéoblastes (Sambrook *et al*, 1993). La fenêtre thérapeutique étant toutefois étroite, il faut assurer un suivi de la calcémie chez les patients sous traitement.

2.1.5.6 *Fluor*

Le fluor est une substance qui stimule la formation osseuse et qui a été discréditée, car l'augmentation de la densité osseuse semble se faire aux dépens d'un os fragilisé. On croit que du calcium de l'os cortical passe vers l'os trabéculaire, ce qui augmente le risque de fractures (Riggs *et al*, 1990).

2.1.5.7 *PTH*

La PTH administrée à petites doses intermittentes stimule la formation osseuse en exerçant une influence sur un facteur de croissance dit « insulin-like », mais son activité reste limitée dans le temps (Riggs *et al*, 1992). L'emploi clinique de la PTH est aussi limité par sa nature protéique et les difficultés d'administration qui y sont reliées.

2.1.5.8 *Strontium*

Certains éléments chimiquement semblables au calcium, tel que le strontium, possèdent des effets pharmacologiques sur le tissu osseux lorsqu'ils sont présents à des niveaux supérieurs à ceux normalement requis par la physiologie. Il a été démontré que le strontium exerce plusieurs effets sur les cellules osseuses. En plus de son activité anti-résorption, le strontium possède une activité anabolique sur

l'os. Ainsi, le strontium pourrait être un agent potentiellement intéressant pour le traitement de l'ostéoporose (Marie *et al*, 2001).

2.2 La maladie de Paget

2.2.1 Définition

La maladie de Paget est une maladie osseuse localisée et progressive caractérisée par une augmentation du remodelage osseux, une hypertrophie de l'os et des défauts de la structure osseuse.

2.2.2 Épidémiologie

La maladie de Paget est une maladie plutôt commune. Dans plusieurs pays, elle se retrouve au deuxième rang des maladies métaboliques de l'os derrière l'ostéoporose. On estime que 3 % de la population âgée de plus de 50 ans sont affectés par cette maladie. La maladie de Paget est presque toujours diagnostiquée chez des patients de plus de 40 ans et elle est beaucoup plus fréquente chez l'homme que chez la femme. De travaux récents ont montré la présence d'une prédisposition génétique chez les patients.

2.2.3 Pathophysiologie

Pour des raisons encore inconnues, on retrouve une résorption osseuse anormalement élevée à certains endroits du squelette associée à une augmentation de la formation osseuse. Une infection lente aux paramyxovirus et les prédispositions génétiques seraient les causes de la maladie. L'étape initiale est l'élévation anormale de la résorption osseuse faite par les ostéoclastes. On retrouve

ensuite une augmentation compensatoire de la formation osseuse secondaire faites par les ostéoblastes qui a pour effet de créer une balance positive de formation osseuse. Ce phénomène provoque des lésions sclérotiques et des déformations locales du squelette.

2.2.4 Manifestations cliniques

La maladie de Paget est asymptomatique; elle est souvent découverte à la suite d'une mesure routinière de la phosphatase alcaline sérique ou par un examen radiographique. Seulement 5 % des patients montrent des symptômes. Les symptômes les plus fréquents sont la douleur qui peut être due à des micro-fractures et la déformation des os. La courbure des os longs et de la colonne vertébrale, l'élargissement des os, particulièrement ceux du crâne sont les principales déformations retrouvées chez les patients souffrant de la maladie de Paget. Les difformités osseuses peuvent aussi causer la compression des nerfs et des vaisseaux avec des complications cliniques graves.

2.2.5 Traitement

Pratiquement, les seuls traitements contre la maladie de Paget sont la calcitonine et les bisphosphonates. La calcitonine peut être efficace pour décroître le remaniement osseux et améliorer les signes cliniques et les symptômes. Cependant, la calcitonine montre certains désavantages lorsqu'elle est comparée aux bisphosphonates. Son effet est moins prononcé que celui des bisphosphonates et il y a des risques de développer une résistance à la calcitonine compte tenu de sa

nature protéique et de son origine animale. La thérapie de choix contre la maladie de Paget est donc un biphosphonate.

3 LES PROSTAGLANDINES

3.1 Voie biosynthétique

Les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TX) font partie de la famille des prostanoïdes qui sont des produits des cyclooxygénases (COX) dérivés des acides gras non-saturés de type C-20 (Figure 2). Les prostaglandines sont composées d'un anneau cyclopentane auquel sont attaché deux chaînes latérales nommées α et ω . Selon la modification faite à l'anneau cyclopentane, les PGs sont classifiées en différents types identifiés par les lettres de A à I parmi lesquelles les types A, B et C ne semblent pas être produits naturellement mais seraient plutôt créés de façon artificielle durant l'extraction (Narumiya *et al*, 1999). Chez les thromboxanes, un autre produit des COXs, un anneau oxane remplace l'anneau cyclopentane. De plus, les prostanoïdes sont classifiés en trois catégories (1, 2 et 3) dépendamment du nombre de double liens retrouvés au niveau de leurs chaînes latérales. Les prostanoïdes de la série 1 possèdent un double lien au niveau du treizième carbone, ceux de la série 2 possèdent deux double liens qui se retrouvent au niveau du cinquième et du treizième carbone tandis la série 3 regroupe les prostanoïdes qui possèdent trois doubles liens que l'on retrouve sur le cinquième, treizième et dix-septième carbone. Les prostanoïdes des séries 1, 2 et 3 sont produites à partir de l'acide γ -homolinolénique (acide 8,11,14-eicosaénoïque), acide arachidonique (acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque) et l'acide 5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque respectivement. Dû au fait que l'acide arachidonique est le

précurseur le plus abondant chez la plupart des mammifères, les prostanoïdes de la série 2 sont donc synthétisées de façon prédominante. Les acides gras précurseurs des prostanoïdes sont libérés des phospholipides membranaires par l'action de la phospholipase A₂ et sont convertis en différentes prostanoïdes par l'action séquentielle des cyclooxygénases et de différentes synthases. Les prostaglandines ainsi formées sont immédiatement relâchées à l'extérieur de la cellule. Les prostaglandines de type G, H, I et les thromboxane A sont très instables chimiquement étant transformées en des produits inactifs en quelques secondes. Malgré le fait que les autres PGs sont chimiquement stables, elles sont métabolisées rapidement. Les prostanoïdes ayant un temps de demi-vie très court agiront seulement de façon locale, à proximité de l'endroit où elles sont produites (Narumiya *et al*, 1999).

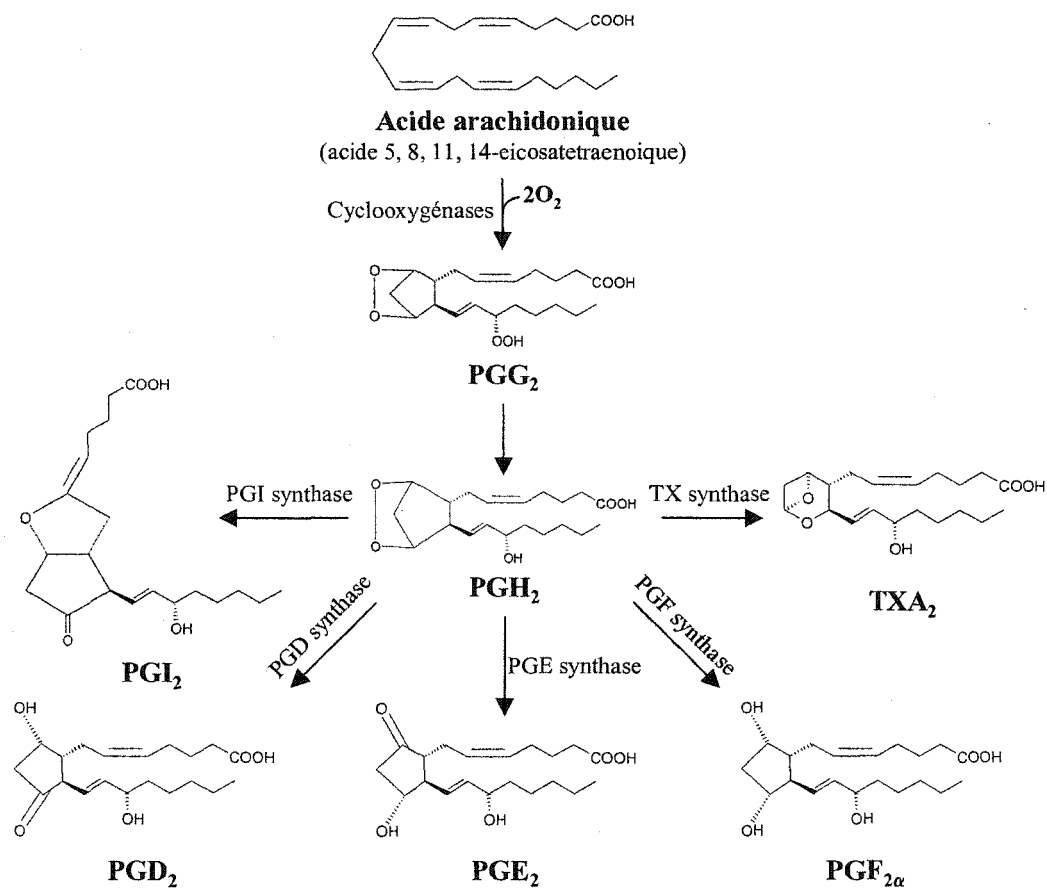


Figure 2. Voie de synthèse des prostanoïdes.

3.2 Les cyclooxygénases

La cyclooxygénase (COX), aussi appelée la prostaglandine H₂ synthase (PGHS), est l'enzyme qui catalyse les deux premières étapes de la biosynthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Ces étapes sont l'oxydation de l'acide arachidonique et la réduction de la PGG₂ pour former la PGH₂. La cyclooxygénase a été clonée en 1988 (DeWitt *et al*, 1988;Merlie *et al*, 1988;Yokoyama *et al*, 1988) et la découverte, au début des années 90, de l'existence d'une deuxième isoforme de la COX a été un événement majeur dans la biologie des prostanoïdes. Les isoenzymes COX-1 et COX-2 ont été classifiées comme étant respectivement physiologique et inflammatoire, mais ceci constitue une simplification excessive d'un processus complexe. La cyclooxygénase-2 est indétectable dans la plupart des tissus, mais son expression peut être rapidement induite en réponse à différents stimuli tels que les facteurs de croissance, les promoteurs de tumeurs, certaines hormones, les endotoxines bactériennes et les cytokines (Smith *et al*, 1996). Les deux isoformes possèdent un poids moléculaire de 71 KD et ont 63 % d'homologie dans leur séquence (Vane *et al*, 1998). Le gène humain de la COX-2 est un petit gène précoce de 8.3 kb tandis que la COX-1 provient d'un gène beaucoup plus gros de 22 kb. Les produits de ces gènes diffèrent également, l'ARN messager de la COX-2 étant de 4.5 kb et celui de la COX-1 de 2.8 kb (Otto *et al*, 1995;Herschman, 1996). Malgré leur ressemblance structurale, il existe des différences importantes entre les deux isoformes quant aux substrats transformés et à la sélectivité des inhibiteurs. On sait que la COX-2 est capable de transformer une plus grande variété d'acides gras que la COX-1 (Otto

et al, 1995). Les deux enzymes transforment l'acide arachidonique avec la même efficacité mais la COX-2 est aussi capable d'oxygéner d'autres composés tel que les acides γ -linolénique, α -linolénique, et linoléique plus efficacement que la COX-1 (O'Neill *et al*, 1994). La découverte de la COX-2 a mis en évidence de grandes différences au niveau de la pharmacologie des deux isoenzymes (Mitchell *et al*, 1993). Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) tels que l'aspirine et l'indométhacine, qui inhibent fortement la COX-1, provoquent beaucoup d'effets secondaires dont des problèmes d'estomac (Lanza, 1989). Les composés qui agissent plus puissamment sur la COX-2 et qui possèdent un meilleur ratio d'activité COX-2/COX-1 seront de meilleurs agents anti-inflammatoires et provoqueront moins d'effets secondaires. Plusieurs compagnies pharmaceutiques ont développé de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la COX-2. Parmi les composés les plus sélectifs disponibles en ce moment, on retrouve le DFU, 1000 fois plus sélectif envers COX-2 que COX-1 (Riendeau *et al*, 1997) et le NS-398 (Futaki *et al*, 1994). Parmi les inhibiteurs sélectifs de la COX-2 présentement disponible au public on retrouve le rofecoxib et le celecoxib. Lors d'essais d'activité enzymatique *in vitro*, il a été démontré que le rofecoxib possède un ratio IC_{50} COX-1 / IC_{50} COX-2 de 267 tandis que le celecoxib possède un ratio de 30 (Patrono *et al*, 2001), démontrant ainsi une plus grande spécificité pour l'inhibition de la COX-2.

3.3 Les récepteurs

Différents types et sous-types de récepteurs aux prostaglandines ont été décrits sur la base de données pharmacologiques (Coleman *et al*, 1994; Narumiya *et al*, 1999).

La nomenclature DP, EP, FP, IP et TP reconnaît l'existence de récepteurs spécifiques aux cinq types de prostanoïdes naturelles, PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂ et TxA₂, respectivement. Jusqu'à maintenant, quatre sous-types de récepteur EP ont été décrits : EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄. Des agonistes sélectifs sont disponibles pour tous les récepteurs sauf pour le sous-type EP₄, ainsi que des antagonistes sélectifs pour les récepteurs DP, EP₁, EP₄ et TP.

Tous les récepteurs aux prostaglandines ont été clonés; ce sont des récepteurs de type rhodopsine possédant 7 domaines trans-membranaires (Narumiya *et al*, 1999). Dépendamment de l'espèce, le récepteur EP₃ peut avoir de trois à sept isoformes produites grâce à l'épissage alternatif, ce qui détermine différentes spécificités aux protéines G et le couplage aux systèmes de seconds messagers (Namba *et al*, 1993), tout en conservant la même spécificité aux agonistes et antagonistes.

3.3.1 Pharmacologie des récepteurs

Chacun des huit types et sous-types de récepteurs possède une spécificité au niveau de la liaison avec leurs ligands qui leur permettent de se distinguer des autres.

3.3.1.1 Récepteur DP

Le ligand endogène préférentiel du récepteur DP est la PGD₂. Cependant, la PGD₂ exerce aussi une forte activité agoniste sur les récepteurs FP et TP (Coleman *et al*, 1981). Il existe plusieurs agonistes sélectifs pour le récepteur DP, le plus utilisé étant le BW245C (Town *et al*, 1983). On retrouve aussi des antagonistes sélectifs

pour le récepteur DP : le BWA868C (Giles *et al*, 1989) et le ZK138357 (Lydford *et al*, 1996). Le récepteur DP est connu pour être capable d'induire une augmentation de l'AMPc intracellulaire en activant l'adénylate cyclase via une protéine G_s (Halushka *et al*, 1989). Cependant, il a été démontré que le récepteur DP pouvait aussi provoquer une augmentation du calcium intracellulaire (Boie *et al*, 1995; Imamura *et al*, 1995; Sarrazin *et al*, 2001).

3.3.1.2 Récepteur EP_1

La sulprostone a été le premier composé à être identifié comme étant un puissant agoniste pour le récepteur EP_1 . Cependant il a été démontré comme étant aussi puissant envers le récepteur EP_3 (Bunce *et al*, 1991). En fait, jusqu'à maintenant il n'y a pas de composé hautement sélectif pour le récepteur EP_1 décrit. Deux composés se sont avérés utiles dans l'étude du récepteur EP_1 : le 17-phényl- ω -trinor PGE_2 (Lawrence *et al*, 1992) et l'iloprost (Senior *et al*, 1991). La sélectivité du 17-phényl- ω -trinor PGE_2 est seulement de 10 fois supérieure pour EP_1 que pour les récepteurs EP_2 et EP_3 , ce qui limite grandement son utilité pour caractériser les sous-types de récepteur EP. Cependant, l'iloprost est beaucoup plus sélectif pour le récepteur EP_1 que pour les autres récepteurs EP mais il a été décrit comme étant seulement un agoniste partiel pour le récepteur EP_1 . De plus, l'iloprost étant un analogue de la PGI_2 , il possède une activité agoniste très forte pour le récepteur IP. Le récepteur EP_1 effectue son effet biologique via une protéine G_q en augmentant le niveau de Ca^{++} intracellulaire.

3.3.1.3 Récepteur EP₂

Il y a plusieurs composés qui ont été identifiés comme étant des agonistes du récepteur EP₂ mais seulement deux sont des agonistes sélectifs : le butaprost (Gardiner, 1986) et le AH13205 (Regan *et al*, 1994). Malgré le fait qu'ils soient sélectifs pour le récepteur EP₂, ces composés possèdent une puissance qui est de 10 à 100 fois moins élevée que la PGE₂ pour activer ces récepteurs, ce qui limite leur utilité. Il n'y a encore aucun antagoniste décrit pour le récepteur EP₂. Le récepteur EP₂ est couplé aux protéines G_s, il est donc capable d'induire une augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire.

3.3.1.4 Récepteur EP₃

Beaucoup d'agonistes pour le récepteur EP₃ ont vu le jour grâce aux efforts des compagnies pharmaceutiques pour développer des drogues anti-ulcéreuses. Le misoprostol en est un exemple (Collins, 1986). Cependant, la majorité des composés qui ont été décrits possède une activité agoniste sur les autres sous-types EP et même sur d'autres types de récepteurs aux prostanoïdes. Trois composés se montrent plus sélectifs pour le récepteur EP₃ que les autres : l'enprostil, le GR63799 et le sulprostone (Bunce *et al*, 1991). Ces composés ne sont pas extrêmement sélectifs mais ils ont l'avantage d'être des agonistes beaucoup plus puissants pour le récepteur EP₃ que pour les autres. Malgré toute la recherche en chimie des prostanoïdes, il n'y a aucun antagoniste rapporté pour le récepteur EP₃. On connaît maintenant six isoformes du récepteur EP₃ chez l'humain, soit EP_{3a}, EP_{3b}, EP_{3c}, EP_{3d}, EP_{3e} et EP_{3f} (Regan, 1994; An 1994; Schmid 1995). Tous ces sous-types peuvent amener une diminution de l'AMPc et les sous-types EP_{3a}, EP_{3b} et

EP_{3c} peuvent aussi causer une augmentation du calcium intracellulaire (Schmid, 1995)

3.3.1.5 Récepteur EP₄

Aucun agoniste sélectif n'a été décrit pour le récepteur EP₄. Cependant, le 11-déoxy-PGE₁ agit comme agoniste à la fois sur le récepteur EP₄ et sur le récepteur EP₂ (Dong *et al*, 1986; Brum-Fernandes *et al*, 1996). Une des caractéristiques du récepteur EP₄ qui le distingue des autres sous-type EP est qu'il peut être bloqué par deux antagonistes : le AH22921 et le AH23848. Ces deux composés sont des antagonistes du récepteur TP qui sont capables de bloquer l'activité du récepteur EP₄ à une puissance cent fois plus faible que celle du récepteur TP (Coleman *et al*, 1994). Malgré sa faible activité antagoniste, le AH23848 a l'avantage de ne pas agir sur les autres sous-types du récepteur EP (Coleman *et al*, 1994). Le récepteur EP₄ est couplé aux protéines G_s, il induit donc une augmentation de l'AMPc intracellulaire lorsque qu'il est activé.

3.3.1.6 Récepteur FP

La PGF_{2α} est un puissant agoniste du récepteur FP, mais il n'est pas très sélectif. Il possède des activités agonistes appréciables sur les récepteurs EP et TP (Coleman *et al*, 1994). Par contre, le fluprosténol et le cloprosténol ont été décrits comme étant aussi puissants que la PGF_{2α} sur les récepteurs FP tout en possédant une activité agoniste moins élevée sur les autres type de récepteurs. Il n'existe pas d'antagonistes pour les récepteurs FP. L'activation du récepteur FP est couplé à une augmentation du calcium intracellulaire via les protéines G_q.

3.3.1.7 Récepteur IP

La PGI₂, le ligand endogène du récepteur IP, est chimiquement très instable. Il est donc impossible d'utiliser la PGI₂ en tant qu'agoniste du récepteur IP. Beaucoup d'efforts ont été faits pour développer des analogues synthétiques de la PGI₂. Cependant, les gains obtenus au niveau de la stabilité se faisaient au détriment de la puissance de l'activité agoniste sur le récepteur IP. La carbaprostacycline, un analogue de la PGI₂, est sélective pour les récepteurs IP mais possède une faible activité agoniste (Armstrong *et al*, 1989). Aucun antagoniste n'est encore connu pour les récepteurs IP. Le récepteur IP est couplé aux protéines G_s, donc son mécanisme de transduction passe par l'activation de l'adénylate cyclase, ce qui entraîne une augmentation de l'AMPc intracellulaire.

3.3.1.8 Récepteur TP

Contrairement aux autres récepteurs, il existe quelques agonistes sélectifs et plusieurs antagonistes pour les récepteurs TP. Le U46619 est l'agoniste qui est le plus sélectif et le plus utilisé (Malmsten, 1976). Il existe toute une série d'antagonistes pour les récepteurs TP, parmi lesquels on retrouve le AH23848 qui agit puissamment sur les récepteurs TP et faiblement sur les récepteurs EP₄ (Coleman *et al*, 1994). L'activation du récepteur TP induit une augmentation du niveau de calcium intracellulaire dû au fait qu'il est couplé aux protéines G_q.

Tableau 1. Protéines G et seconds messagers

Récepteurs	Protéines G	Seconds messagers
DP	G _q	↑ Calcium intracellulaire
IP	G _s	↑ AMPc intracellulaire
FP	G _q	↑ Calcium intracellulaire
EP ₁	G _q	↑ Calcium intracellulaire
EP ₂	G _q	↑ Calcium intracellulaire
EP _{3a} , EP _{3b} , EP _{3c} , EP _{3d} , EP _{3e} , EP _{3f}	G _i	↓ AMPc intracellulaire
EP _{3a} , EP _{3b} , EP _{3c}	G _q	↑ Calcium intracellulaire
EP ₄	G _s	↑ AMPc intracellulaire
TP	G _q	↑ Calcium intracellulaire

3.3.2 L'effet des prostaglandines sur l'os

En 1970, il a été démontré que la prostaglandine E₂ était capable d'induire une augmentation de l'AMPc et de stimuler la résorption osseuse dans une culture organotypique d'os de rat (Klein *et al*, 1970). Depuis ce temps, plusieurs autres évidences sont venues confirmer que les prostaglandines ont un rôle important dans la régulation du métabolisme de l'os. Ces évidences ont aussi montré que le mécanisme de régulation de l'os par les prostaglandines est très complexe. Les prostaglandines sont des modulateurs multifonctionnels qui peuvent agir en tant que stimulateurs ou inhibiteurs sur la formation ou la résorption de l'os. La production de prostaglandines au niveau de l'os semble bien régularisée. Jusqu'à maintenant, nous savons que les ostéoblastes expriment la COX-2 et qu'ils sont capables de synthétiser des prostaglandines (Brum-Fernandes *et al*, 1994). Cependant, la production de prostaglandines par les autres cellules de l'os et par les cellules des tissus avoisinants pourrait aussi avoir des influences importantes sur le métabolisme osseux. Malgré le fait que la PGE₂ semble la prostaglandine la

plus abondante dans une culture organotypique osseuse, la prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) et la prostacycline (PGI_2) sont aussi synthétisées par le tissu osseux (Raisz *et al*, 1979; Voelkel *et al*, 1980).

3.3.3 Les prostaglandines dans la résorption osseuse

La plupart des premières études sur l'implication des prostaglandines sur le métabolisme osseux se sont attardées à leurs effets sur la résorption osseuse. Les résultats de ces études ont montré que la PGE_2 était la prostaglandine la plus abondante dans l'os (Raisz *et al*, 1979; Voelkel *et al*, 1980) et que les prostaglandines de la série E étaient les plus puissants activateurs de la résorption (Raisz *et al*, 1989; Raisz *et al*, 1989). On retrouve ensuite la PGI_2 qui est la deuxième prostaglandine en abondance dans l'os (Raisz *et al*, 1979) mais, dans un système de culture organotypique, elle ne semble pas être impliquée de façon importante au niveau de la résorption (Tashjian, Jr. *et al*, 1988). Finalement, on retrouve de petites quantités de $PGF_{2\alpha}$ au niveau de l'os et lorsque l'on applique de la $PGF_{2\alpha}$ exogène dans une culture organotypique, la résorption osseuse est augmentée. Cependant, il a été démontré que cette augmentation est due, au moins en partie, à l'augmentation de production de PGE_2 endogène (Raisz *et al*, 1990). Des études *in vivo* chez les animaux et chez les humains suggèrent que les prostaglandines peuvent être responsables de l'hypercalcémie que l'on retrouve en présence de tumeurs malignes (Minkin *et al*, 1981; Tashjian, Jr. *et al*, 1987) ainsi que de la perte osseuse due à l'inflammation dans les maladies périodontales (Harris *et al*, 1973; Harvey *et al*, 1984) et l'arthrite rhumatoïde (Robinson *et al*, 1975). La production de prostaglandines est aussi impliquée dans le relâchement

des prothèses orthopédiques (Goldring *et al*, 1983; Horowitz *et al*, 1994). L'effet activateur de résorption de la PGE₂ dans des systèmes complexes *in vivo* semble être dû à sa capacité d'augmenter le taux de différenciation des précurseurs en ostéoclastes matures (Suzawa *et al*, 2000; Li *et al*, 2000). D'un autre côté, il a été montré que la PGE₂ est capable d'agir directement sur les ostéoclastes et d'inhiber la résorption osseuse (Fuller *et al*, 1989; Mano *et al*, 2000). Les prostaglandines peuvent donc être à la fois des activateurs et des inhibiteurs de la résorption osseuse, dépendamment de leurs sites d'action.

3.3.4 Les prostaglandines dans la formation osseuse

Les travaux initiaux ont démontré que les prostaglandines avaient des effets stimulateurs et inhibiteurs sur la production de collagène dans les cultures organotypique (Blumenkrantz *et al*, 1972; Raisz *et al*, 1974). Il a été démontré par la suite que la PGE₂ a un effet biphasique sur la synthèse de collagène dans une culture de boîte crânienne de rat (Chyun *et al*, 1984). A faible concentration, la PGE₂ augmente la production de collagène et à forte concentration, elle la diminue. Les prostaglandines sont capables d'induire la différenciation des cellules osseuses en culture et accélèrent la formation de nodules minéralisés *in vivo* (Koshihara *et al*, 1989; Flanagan *et al*, 1992). La PGE₂ stimule la réplication des pré-ostéoblastes (Gronowicz *et al*, 1994) et provoque un effet biphasique sur la synthèse d'ADN et l'activité de la phosphatase alcaline chez les cellules ostéoblastiques (Hakeda *et al*, 1985; Hakeda *et al*, 1986). La PGE₂, à faible concentration, stimule l'activité de la phosphatase alcaline (Hakeda

et al, 1985). Dans les cultures cellulaires, la PGE₂ est capable d'induire la synthèse d'ADN (Hakeda *et al*, 1987).

3.3.5 Prostaglandines et autres modulateurs

Il existe beaucoup de facteurs capables de moduler le métabolisme osseux. Certain de ces facteurs tel que les interleukines (IL-1, IL-3, IL-6 et IL-11), le M-CSF (Macrophage-colony stimulating facteur), le TNF (Tumor necrosis factor) et le RANKL augmentent la résorption. Tandis que d'autres tels que l'interféron- γ , l'interleukine-4 et 13 ainsi que l'ostéoprotégérine inhibent la résorption osseuse.

Les effets de ces différents facteurs sur les cellules osseuses ont été étudiés de façon rigoureuse par le passé. Il a été démontré que la stimulation de la résorption faite par les interleukine-1, 3, 6 et 11 ainsi que par le TNF alpha étaient médiés par les prostaglandines. Ces cytokines provoquent leurs effets en augmentant l'expression de la cyclooxygénase-2 ce qui augmente le niveau de prostaglandines. Les prostaglandines produites sont alors capables d'induire l'ostéoclastogénèse et augmenter l'activité des ostéoclastes, provoquant ainsi une augmentation de la résorption osseuse. En effet, ces cytokines (IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, TNF alpha) augmentent le nombre d'ostéoclastes ainsi que la résorption osseuse. Cette induction est inhibée par des inhibiteurs des cyclooxygénases (indométhacine et NS-398) et renversée par l'addition de PGE₂ exogène (Lader *et al*, 1998;Stephan *et al*, 1999;Brandstrom *et al*, 2001).

D'autres composés tels que l'interleukine-4 et l'interleukine-13 sont capables d'inhiber la résorption osseuse. Il a été démontré que l'effet inhibiteur de ces cytokines sur la résorption osseuse était dû à leur capacité de diminuer l'expression de la cyclooxygénase-2, diminuant ainsi le niveau de prostaglandines chez les ostéoblastes (Onoe *et al*, 1996).

Les prostaglandines sont aussi impliquées dans le mécanisme d'action de d'autres régulateurs importants du métabolisme osseux tel que le RANKL et l'OPG. En effet, les prostaglandines sont capables d'induire l'expression du RANKL chez les précurseurs ostéoclastiques, ce qui favorise l'ostéoclastogénèse et augmente la résorption osseuse. Et de l'autre côté, les prostaglandines inhibent la synthèse d'ostéoprotégérine connue pour inhiber l'ostéoclastogénèse et la résorption osseuse (Aubin *et al*, 2000).

Les prostaglandines jouent donc un rôle essentiel dans le mécanisme d'action de certains régulateurs du métabolisme osseux. Comme on vient de le voir, la synthèse de prostaglandines peut être modulée soit à la hausse ou à la baisse par beaucoup de facteurs et peut à son tour influencer l'expression de protéines ayant des effets importants sur le métabolisme osseux. Ces observations démontrent clairement que les prostaglandines sont des médiateurs très importants qui semblent jouer un rôle central dans la régulation du métabolisme osseux. Cependant, les cellules sur lesquelles les prostaglandines exercent leurs effets dans la régulation de métabolisme osseux ne sont pas encore clairement identifiées. C'est pourquoi il est important de connaître les facteurs capables de moduler la production de

prostaglandines et la distribution des récepteurs aux prostaglandines chez les cellules de l'os.

3.3.6 Récepteurs impliqués

Quelques études ont tenté de déterminer quels étaient les récepteurs aux prostaglandines impliqués dans la modulation des cellules de l'os. Chez les cellules ostéoblastiques isolées de la boîte crânienne de rat, il a été démontré que la PGE₂, agissant via le récepteur EP₁, provoque une augmentation de la formation de nodules minéralisés, de l'activité de la phosphatase alcaline et une baisse de l'incorporation de la thymidine marquée favorisant ainsi la différenciation (Fujieda *et al*, 1999). Cependant, dans le même modèle, lorsque la PGE₂ interagit avec les récepteurs EP₂ et EP₄, elle inhibe la différenciation et stimule la prolifération (Fujieda *et al*, 1999). Le phénomène opposé a été décrit chez les cellules ostéoblastiques de souris MC-3T3-E1 où l'activation du récepteur EP₁ stimule la prolifération et abaisse l'expression de la phosphatase alcaline tandis que l'activation des récepteurs EP₂ et EP₄ diminue la prolifération et augmente la différenciation (Suda *et al*, 1996; Suda *et al*, 2000). L'effet de la PGE₂ sur les cellules ostéoblastiques semble donc non seulement varier d'une espèce à l'autre mais aussi chez une même espèce selon l'âge. En effet, la PGE₂ augmente de façon significative la formation de nodules minéralisés chez les cellules isolées à partir de jeunes rats et elle la diminue chez des cellules isolées de rats plus âgés (Fujieda *et al*, 1999; Kaneki *et al*, 1999).

Il a été montré que les récepteurs EP₂ (Inoue *et al*, 1999; Li *et al*, 2000) et EP₄ (Suzawa *et al*, 2000; Sakuma *et al*, 2000) sont importants pour l'ostéoclastogénèse chez les rongeurs. *In vivo*, les deux récepteurs participent dans la perte osseuse induite par la PGE₂ chez la souris (Suzawa *et al*, 2000). La distribution des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes et les précurseurs ostéoclastiques étant encore inconnus, il est difficile de déterminer si ces effets sont dus à la présence des récepteurs chez les ostéoclastes ou chez les ostéoblastes.

BUT

Les effets des prostaglandines sur l'os semblent paradoxaux. Certaines études démontrent qu'elles ont la capacité d'augmenter la résorption osseuse et d'autres études démontrent le contraire. Pour élucider ce paradoxe, nous devons connaître quelles cellules, présentes dans l'os, sont capables de produire les prostaglandines ainsi que la distribution des récepteurs sur ces cellules.

Il a été démontré que les ostéoblastes humains peuvent produire des prostaglandines, car ils expriment la COX-2 (Brum-Fernandes *et al*, 1994). De plus, les récepteurs présents chez les ostéoblastes humains ont été caractérisés (Sarrazin *et al*, 2001). Nous savons que les ostéoblastes humains expriment les récepteurs DP, EP₄, IP, FP et TP. L'étude sur l'implication de ces récepteurs dans les fonctions des ostéoblastes est en cours dans notre laboratoire. Cependant, pour comprendre les effets des prostaglandines, nous devons aussi savoir si les ostéoclastes peuvent synthétiser les prostaglandines et connaître la distribution des récepteurs et leurs effets chez les ostéoclastes. Le but de cette étude est de mieux comprendre les effets des prostaglandines chez les ostéoclastes matures. Les objectifs sont donc de caractériser l'expression des cyclooxygénases ainsi que l'expression des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes matures fœtaux et de vérifier l'implication des récepteurs présents dans la régulation de l'activité de ces ostéoclastes.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

4 CULTURE CELLULAIRE

4.1 Extraction des ostéoclastes

La méthode d'extraction d'ostéoclastes humains matures a été élaborée en se basant sur une méthode similaire décrite par Chambers *et al* pour extraire des ostéoclastes de lapins (Chambers *et al*, 1982). Les ostéoclastes matures ont été extraits à partir d'os long de fœtus dont l'âge variait entre 14 et 20 semaines de gestation. Les fœtus ont été obtenus suite à la signature par la mère d'un consentement éclairé conformément à la loi civile du Québec. Les tibias et les fémurs ont été prélevés et dénudés de tout le tissu conjonctif. Les os ont ensuite été coupés transversalement dans un pétri de 10 cm contenant 6 ml de milieu α -MEM (Sigma, Oakville, ON) supplémenté de 10 % FBS à pH 6.8. Les os ont ensuite été grattés à l'aide d'un scalpel pour les réduire en de très petits fragments. Les os émincés et le milieu ont été transférés, à l'aide d'une pipette sérologique en plastique, dans un tube conique de 15 ml et vortexés à vitesse moyenne pendant 30 secondes. La préparation a été laissée au repos pendant environ 1 minute afin de laisser les fragments d'os sédimenter. Ensuite, 200 μ l du surnageant ont été placés en culture sur des lamelles de verre selon les exigences de la procédure. Pour les expériences de microscopie confocale, des lamelles circulaires de 25 mm disposées dans un Pétri de 30 mm ont été utilisées et pour toutes les autres procédures des lamelles de 22 mm X 22 mm disposées dans des plaques de culture cellulaire à 6 puits ont été utilisées. Pour permettre l'attachement des ostéoclastes,

les cellules ont été placées dans l'incubateur à 37 °C dans un environnement constitué de 5 % CO₂ pendant 45 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS pour retirer les cellules non-adhérentes. Les cellules ont été gardées dans 2 ml de α -MEM 10% FBS pH 6.8 dans l'incubateur à 37 °C jusqu'à leur utilisation, environ 24 heures plus tard.

4.2 NIH-3T3

Les NIH-3T3 ont été achetées chez ATCC et gardées en culture sur des lamelles circulaires de 25 mm dans du DMEM supplémenté de 10% FBS et 2 mM pénicilline-streptomycine.

5 EXPRESSION DE LA TRAP

La présence de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) a été démontrée en effectuant une coloration enzymatique avec une trousse commerciale (Sigma, Oakville, ON). En résumé, les cellules ont d'abord été rincées 2 fois avec du PBS pour ensuite être fixées pendant 2 minutes avec un mélange 1:1 d'acétone et de méthanol. Le fixateur a été aspiré et un séchage à l'air libre de 5 minutes a permis l'évaporation complète du fixateur. Par la suite, les cellules ont été incubées 10 minutes à 37 °C avec la solution de coloration contenant 50 mM tartrate (Sigma, Oakville, ON). Les cellules ont ensuite été rincées à l'eau et les lamelles ont été montées sur des lames de microscope et observées en microscopie à champ clair dans le but d'évaluer la présence de la TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase) qui provoque une coloration rouge.

6 COLORATION DES FILAMENTS DE F-ACTINE

Pour montrer la présence des différentes structures d'actine chez les ostéoclastes, nous avons utilisé une approche déjà décrite dans la littérature (Zhang *et al*, 1995) qui consiste à faire une coloration enzymatique pour la TRAP suivie d'un marquage des filaments de F-actine.

Vingt-quatre heures après l'extraction, le milieu des ostéoclastes a été remplacé par 2 ml de nouveau milieu α -MEM contenant 2 mM indométhacine (Sigma, Oakville, ON). Les cellules ont été incubées 1 heure à 37 °C avant l'addition des composés pour permettre un retour à l'équilibre des structures d'actine. Lors des expériences comportant plusieurs temps de traitement (3,6,9,12,18 et 24 heures ou 5,10 et 30 minutes), les composés ont été ajoutés au temps zéro et la réaction a été arrêtée à chacun des temps en aspirant le milieu et en ajoutant 1 ml de la solution de fixation. La même procédure a été effectuée pour les expériences comportant plusieurs concentrations sauf que les cellules ont été fixées après 5 minutes de stimulation avec les composés.

Les cellules ont été fixées avec du PBS contenant 3.7 % de formaldéhyde pendant 10 minutes et rincées 2 fois avec du PBS. Les cellules ont été perméabilisées avec du PBS contenant 0.1 % Triton-X-100 pendant 5 minutes. Après 2 rinçages au PBS, les cellules ont été incubées avec la solution de coloration TRAP de la trousse #387-A de Sigma (Sigma, Oakville, ON) (Voir section Méthodologie 2.1) pendant 10 minutes. Après 2 lavages avec du PBS, 200 μ l de PBS contenant 5 μ M de phalloïdine (Molecular Probe, Eugene, OR) conjuguée à la rhodamine ont été déposés sur chaque lamelle pendant 20 minutes.

Les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS et les lamelles ont été montées sur des lames de microscope.

7 *DOSAGE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE*

Pour évaluer si les ostéoclastes étaient sensibles à la calcitonine, nous avons vérifié l'effet de cette hormone sur le niveau de calcium intracellulaire. Pour ce faire, les cellules ont été gardées en culture sur des lamelles circulaires de 25 mm dans du α -MEM pendant 24 heures. Les cellules ont été rincées 2 fois avec le tampon Tyrode (Sigma, Oakville, ON) contenant 0.1 mM BSA avant d'être chargées avec 2 μ M de Fluo-3 dissout dans du tampon Tyrode contenant 0.1 mM BSA (Sigma, Oakville, ON) pendant 45 minutes. Les cellules ont été rincées et incubées avec du tampon Tyrode sans BSA pendant 15 minutes pour permettre l'hydrolyse de la sonde calcique. Les lamelles ont ensuite été montées dans un bain expérimental où 1 ml de tampon Tyrode a été ajouté. Les acquisitions d'intensité de fluorescence ont été effectuées avant et après l'addition de 1 μ M de calcitonine humaine (Calbiochem, LaJolla, CA). Les cellules sont examinées avec un microscope confocal à balayage (NORAN Instruments Inc., Middleton, WI) muni d'un laser au krypton/argon et couplé à un microscope inversé avec un objectif 100X (Nikon) avec immersion d'huile. Les échantillons ont été excités à 488 nm et l'émission est mesurée à 525-550 nm. Les images numériques sont obtenues avec une moyenne effectuée sur 256 prises d'images et sont accentuées et traitées avec le logiciel INTERVISION (NORAN Instruments Inc.) sur une station informatique Silicon Graphics O2 opérant avec le système d'exploitation UNIX.

8 **RÉSORPTION OSSEUSE**

Des disques d'os bovins ont préalablement été préparés à partir d'un os long de bœuf provenant du boucher local. Des coupes d'os de 200 μm d'épaisseur ont été faites avec une scie à basse vitesse muni d'une lame à diamant (Low speed Isomet). Des disques circulaires ont ensuite été faits à l'aide d'un poinçon à papier et dévitalisés en subissant 3 sonifications de 60 secondes à la puissance maximale. Les disques ont été pré-incubés pendant au moins 1 heure dans du milieu supplémenté de FBS avant les expériences. Suite à la procédure d'extraction, 200 μl de la solution contenant les ostéoclastes ont été déposés sur des disques d'os bovin placés dans une boîte de culture de 96 puits. Les disques ont été gardés dans un incubateur à 37 °C pendant 1 heure pour permettre aux ostéoclastes d'adhérer à l'os. Les disques ont été lavés 3 fois avec du milieu pour retirer les cellules non-adhérentes et gardés en culture pendant une période de 48 heures dans du milieu α -MEM supplémenté de 10 % FBS à pH 6.8. Les disques d'os ont été rincés 2 fois avec du PBS et fixés avec un mélange éthanol-acétone 1:1 pendant 2 minutes. Les disques ont été séchés à l'air pendant 5 minutes et les cellules TRAP positives ont été détectées avec la trousse leucocyte-acid-phosphatase contenant 50 mM L-tartrate. Après avoir compté les cellules TRAP+ présentes sur les disques d'os, ils ont été nettoyés avec du NH_4OH et séchés à l'air. Pour l'observation par microscopie électronique à balayage (MEB), les échantillons ont été déposés sur un support conducteur en aluminium recouvert au préalable d'un auto-collant de carbone. Le disque d'os n'étant pas conducteur de par sa nature, la surface de l'échantillon a été rendue conductrice en déposant une couche d'or palladium d'une

épaisseur de 200 nanomètres à l'aide d'un système de pulvérisation cathodique à froid (cool sputter coater) de marque Hammer. L'observation a été réalisée à l'aide du microscope électronique à balayage JEOL JSM 840A opérant sous une tension d'accélération entre 10 et 20 kilovolts. L'acquisition des photos digitales a été réalisée à l'aide du système d'acquisition digitale PCI Imaging.

9 IMMUNOHISTOCHIMIE

Les ostéoclastes placés en culture sur des lamelles de verre de 22 mm x 22 mm ont été rincés 2 fois avec du PBS. Les cellules ont été fixées pendant 2 minutes avec une solution acétone/méthanol (1:1). Par la suite, la solution a été aspirée et les lamelles ont été séchées à l'air libre. Après cette étape, nous avons la possibilité d'entreposer les lamelles jusqu'à leur utilisation. Pour ce faire, les plaques contenant les lamelles ont été enveloppées dans de la pellicule de plastique et placées à -80°C . Lors de l'utilisation des plaques congelées, les plaques ont été sorties quelques minutes avant le début des manipulations pour leur permettre d'atteindre la température de la pièce. Les lamelles ont été rincées avec de l'eau pendant 2 minutes. L'inactivation des peroxydases endogènes a ensuite été faite en incubant les lamelles dans une solution aqueuse contenant 0.3% H_2O_2 pendant 20 minutes. Les sites de liaison non-spécifiques ont été bloqués en appliquant une solution de PBS contenant 10 % de sérum de chèvre, 0.1 % BSA pendant 30 minutes sur les lamelles. Par la suite, les premiers anticorps (Tableau 2) dilués dans du PBS additionné de 10 % sérum de chèvre ont été appliqués sur les lamelles. Les lamelles ont été incubées jusqu'au lendemain à une température de 4°C . Les lamelles ont subi 2 lavages successifs de 5 minutes sous agitation, le

premier avec du PBS contenant 1 % Triton-X-100 et le deuxième avec seulement du PBS. Une seconde étape de blocage a été faite en incubant les lamelles pendant 30 minutes avec une solution de PBS additionnée de 10 % de sérum de chèvre et de 0.1 % de BSA. La procédure pour la détection des anticorps primaires variait selon la cible. Les anticorps primaires pour la détection des récepteurs aux prostaglandines provenaient du lapin tandis que ceux utilisés pour détecter les cyclooxygénases provenaient de la souris et étaient couplés à la peroxydase. Donc les procédures seront décrites séparément.

9.1 Détection des anticorps anti-récepteurs aux prostaglandines

Pour détecter les anticorps anti-récepteurs, nous avons utilisé des anticorps de mouton anti-IgG de lapin biotinylés. Ces anticorps, utilisés à une dilution 1:150 dans du PBS, ont été appliqués sur les lamelles pendant 1 heure à la température de la pièce. Les lamelles ont été lavées sous agitation pendant 5 minutes avec du PBS. Les anticorps ont été conjugués avec la peroxydase en incubant le réactif ABC, préparé selon le fabriquant à partir de la trousse commerciale ABC de Vector Laboratories (, pendant 30 minutes. Les lamelles ont été lavées pendant 5 minutes avec du PBS avant l'application du substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). La solution DAB a été préparée selon les directives du fabriquant à partir de la trousse commerciale SK-400 de Vector Laboratories (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les lamelles ont été incubées 12 minutes avec la solution DAB et rincées à l'eau pour ensuite être montées sur des lames permettant leur observation sous un microscope.

9.2 Détection des anticorps anti-cyclooxygénases

Des anticorps de mouton anti-IgG de souris couplés à la peroxydase ont été utilisés pour détecter les anticorps anti-cyclooxygénases. Ces anticorps dilués par un facteur 1:100 dans du PBS contenant 10 % de sérum de chèvre ont été appliqués sur les lamelles pendant 1 heure à la température de la pièce. Les lamelles ont ensuite été lavées sous agitation pendant 5 minutes avec du PBS. La révélation s'est faite en appliquant la solution contenant le substrat DAB (3,3'-diaminobenzidine) préparée à l'aide de la trousse commerciale SK-400 de Vector Laboratories (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Le substrat a été incubé avec les lamelles pendant 12 minutes après quoi elles ont été rincées à l'eau et montées pour être observées au microscope.

Cibles	Anticorps utilisés	Références
COX-1	Anti-COX-1 humain de souris biotinylé	# cat. 160110 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)
COX-2	Anti-COX-2 humain de souris biotinylé	# cat. 160112 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI)
EP ₁	Anti-EP ₁ humain de lapin	(Fortier, 2001)
EP ₂	Anti-EP ₂ humain de lapin	(Fortier, 2001)
EP ₃	Anti-EP ₃ humain de lapin	(Fortier, 2001)
EP ₄	Anti-EP ₄ humain de lapin	(Fortier, 2001)

Tableau 2. Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie

10 HYBRIDATION IN SITU

10.1 Fixation

Les cellules gardées en culture sur des lamelles de 22 mm x 22 mm ont été rincées 2 fois avec du PBS. Par la suite, elles ont été fixées en ajoutant un mélange 1:1 d'acétone et de méthanol pendant 2 minutes. Le fixateur a été aspiré et les cellules ont été séchées à l'air libre pendant environ 5 minutes. Les cellules étaient ainsi prêtes pour l'hybridation. Lorsque l'hybridation n'était pas effectuée immédiatement, les cellules étaient conservées à - 80°C enveloppées dans une pellicule de plastique jusqu'à l'utilisation.

10.2 Digestion à la RNase

Une digestion à la RNase a été effectuée sur quelques échantillons pour obtenir un contrôle négatif. Pour ce faire, suite à la fixation, les lamelles ont été incubées avec la RNase exempte de DNase (100 µg/ml) (Roche Diagnostique, Laval QC) dans un tampon 2x SSC à 37 °C pendant 60 minutes. Les lamelles ont été rincées 2 fois avec du PBS et finalement avec le mélange acétone-méthanol puis séchées avant de subir l'hybridation.

10.3 Marquage des sondes d'oligonucléotides

Les oligonucléotides dirigés spécifiquement contre les cyclooxygénases et les différents récepteurs ont été synthétisés d'après les séquences publiées dans GenBank (Tableau 1). Chacun des oligonucléotide trouvés a été soumis à un test d'alignement de séquences contenues dans GenBank (BLAST) pour s'assurer de la

spécificité de la séquence choisie. Les sondes non-radioactives ont été marquées selon la méthode d'ajout de résidus marqués à la digoxigénine (Roche Diagnostique, Laval, QC) à l'extrémité 3' d'oligonucléotides. La réaction de marquage s'est faite avec une trousse commerciale selon les directives du manufacturier (Roche Diagnostics, Laval, Canada). Le tampon de la terminale transférase contenant 5 mM CoCl_2 , 0.05 mM DIG-dUTP, 50 U de terminale transférase et 5 μM de l'oligonucléotide à marquer a été incubé 30 minutes à 37°C. La réaction a été arrêtée en ajoutant 1 μl de 0.2 M EDTA et 1 μl de glycogène 20 mg/ml. Les oligonucléotides ont été précipités en ajoutant 2.5 μl de LiCl 4 M et 75 μl d'éthanol glacé. La réaction a été bien agitée et placée à -80°C pour 30 minutes après lesquelles elle a été centrifugée à la vitesse maximale à 4°C pendant 15 minutes. Le culot a été lavé avec de l'éthanol 70% glacé et séché sous vide avant d'être dissout dans 20 μl d' H_2O -DEPC. Par la suite, la sonde a été diluée dans le tampon d'hybridation contenant 40% formamide, 10% dextran sulfate, 1x de solution Denhardt, 4x SSC, 10 mM DTT et 1 mg/ml d'ARN-t de levure. Pour chacun des oligonucléotides complémentaires marqués, son homologue non-complémentaire a été aussi marqué et utilisé comme contrôle négatif.

Cibles	# accession Genbank	Séquences
COX-1	M59979	5'-TGTGCTCACGTAGCCAGAGCGTGGCATAACA-3'
COX-2	NM_000963	5'-CCTATCAGTATTAGCCTGCTTGTCTGG-3'
EP ₁	NM_000955	5'-AGATGCACGACACCACCATGATACCGACAAGCT-3'
EP ₂	NM_000956	5'-TCCGACAACAGAGGACTGAACGCATTAGTCTCAGAACAGG-3'
EP ₃	NM_000957	5'-ACATGATCCCCATAAGCTGAATGGCCGTCTCGGTCGTGAT-3'
EP ₄	NM_000958	5'-TTCATGTACGTGGCGATGGTCACCGGGCTACCAACAAAGT-3'

Tableau 3. Séquences des oligonucléotides utilisés lors de l'hybridation *in situ*.

10.4 Hybridation

Lorsque que l'hybridation est faite immédiatement après la fixation, on peut procéder immédiatement à l'application de la sonde. Par contre, si les lamelles ont été conservées à -80°C, il est important de les laisser réchauffer et d'attendre que l'humidité provoquée par la condensation ait séchée. Une fois les lamelles bien sèches, 50 µl de la mixture d'hybridation contenant soit l'oligonucléotide complémentaire ou l'oligonucléotide non-complémentaire marqué ont été appliqués sur chacune des lamelles puis recouvertes d'une autre lamelle. Les lamelles ont été placées dans une chambre humide et l'hybridation s'est faite à 40°C pendant 18 heures. Les lamelles supérieures ont été retirées délicatement en étant submergées dans du 2x SSC. Des lavages séquentiels de 10 minutes ont été

effectués à 22°C avec des concentrations décroissantes de SSC (2X, 1X, 0.5X). Finalement, un dernier lavage a été effectué à 40°C avec du 0.5x SSC pendant 60 minutes avant de procéder à la détection de la sonde.

10.5 Détection

Les lamelles ont été lavées 3 fois avec le tampon 1 composé de 100 mM Tris-HCl pH 7.5 et 150 mM NaCl. Ensuite, les lamelles ont été recouvertes avec environ 100 µl de la solution anti-DIG qui contient l'anticorps dirigé contre la digoxigénine (Roche Diagnostics, Laval, Canada), 0.3% Triton X-100 et 1% de sérum normal de mouton. Les lamelles ont été incubées ainsi dans une chambre humide à 22°C pendant 3 heures. Les échantillons ont été lavés 2 fois avec le tampon 1 et incubés pendant 10 minutes dans le tampon 2 composé de 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl et 50 mM MgCl₂. Le tampon 2 a été aspiré et la solution du substrat composée de NBT (*nitroblue tetrazolium*) (0.33 mg/ml) (Roche Diagnostique, Laval, QC), de BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*) (0.175 mg/ml) (Roche Diagnostique, Laval, QC) et de levimasol (0.24 mg/ml) (Sigma, Oakvill, ON) a été ajoutée. La réaction a été incubée dans le noir jusqu'à l'obtention d'un signal, approximativement 8 heures. La réaction est alors arrêtée en aspirant le substrat et en ajoutant du tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM Na₂EDTA) pendant 10 minutes. Les lamelles sont ensuite montées sur des lames de microscope et observées en microscopie à champ clair.

11 ACTIVITÉ CYCLOOXYGÉNASE

L'activité des cyclooxygénases chez les ostéoclastes humains a été déterminée au niveau d'une seule cellule en utilisant la dichlorodihydrofluorescéine diacétate carboxylée (H₂DCFDA). La H₂DCFDA nous permet de suivre le processus d'oxydoréduction provoqué par l'activité des cyclooxygénases (Morita *et al*, 1995). Les cellules mises en culture sur des lamelles circulaires de 25 mm ont été pré-traitées avec soit les inhibiteurs sélectifs des cyclooxygénases ou leurs véhicules pendant une période de 30 minutes dans du tampon Tyrode contenant 0.1 mM BSA. Pendant les 2 dernières minutes du pré-traitement avec les anti-inflammatoires, le SYTO-59, un marqueur nucléaire, a été ajouté pour obtenir une concentration finale de 1 μ M. Les lamelles ont été rincées 3 fois avec du tampon Tyrode contenant 0.1 mM BSA pour ensuite être montées dans le bain expérimental où 1 ml de tampon Tyrode avec 0.1 mM BSA et les anti-inflammatoires a été ajouté. Le bain expérimental a été placé sous le microscope et une cellule multinucléée a été localisée en utilisant le filtre qui permet de visualiser la fluorescence rouge. Par la suite, la H₂DCFDA a été ajoutée au bain expérimental pour obtenir une concentration finale de 2 μ M pour une incubation de 15 minutes. A la fin de l'incubation, une double acquisition de la fluorescence émise par le SYTO-59 et la H₂DCFDA a été prise. Cette acquisition correspond au niveau d'activité basal. Ensuite, l'acide arachidonique qui est le substrat des cyclooxygénases a été ajouté pour atteindre une concentration finale de 30 μ M. Après 1 minute, une deuxième double acquisition de la fluorescence du SYTO-59 et de la H₂DCFDA a été prise, celle-ci correspondant au niveau de fluorescence

après l'ajout d'acide arachidonique. Les cellules ont été examinées avec un microscope à balayage laser confocal (NORAN Instruments Inc, Middleton, WI) équipé d'un laser krypton/argon couplé à un microscope inversé avec une lentille à immersion à l'huile de 40X. Les spécimens ont été excités à des longueurs d'ondes de 488 nm et 568 nm. La fluorescence émise par le SYTO-59 et la H₂DCFDA a été mesurée à des longueurs d'ondes de 525-550 nm et de >590 nm respectivement. Les images digitalisées ont été obtenues avec le logiciel Intervision (NORAN Instruments Inc, Middleton, WI) sur une station Silicon Graphics O2-workstation. La même procédure avait été exécutée avec les NIH-3T3 qui avaient été stimulées avec 100 u/ml d'IL-1 α pendant 3 heures pour accroître l'expression de la COX-2.

RÉSULTATS

12 CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE

La première étape consistait à confirmer la présence d'ostéoclastes matures dans la culture cellulaire. Nous avons donc vérifié les principaux marqueurs qui sont utilisés pour caractériser les ostéoclastes. Les caractéristiques phénotypiques que nous avons vérifiées sont la multinucléation, la présence de la TRAP, la formation de l'anneau d'actine, la réponse à la calcitonine et la capacité de résorber l'os.

12.1 Expression de la phosphatase acide résistante au tartrate

Nous avons déterminé que 4.2 ± 0.6 % des cellules de la préparation étaient TRAP positive et que toutes ces cellules étaient multinucléées (Figure 3). De plus, l'âge fœtal semble avoir une influence sur le nombre de cellules multinucléées TRAP positives (TRAP+) obtenues. Le nombre d'ostéoclastes présents sur des lamelles de 22 mm x 22 mm ayant reçu 200 μ l de suspension cellulaire et n'ayant subi aucun traitement a été compilé pour les différents âges de gestation. Les nombres d'ostéoclastes obtenus dans 200 μ l de suspension cellulaire ont été rapportés sur le volume de suspension cellulaire total obtenu pour chaque fœtus (approximativement 5 ml). Le nombre de cellules TRAP+ isolées diminuait en fonction de l'âge des fœtus. Le nombre de cellules TRAP+ multinucléées par fœtus était maximal entre l'âge de 14 et 16 semaines (approximativement 400 cellules) et diminuait progressivement avec l'âge pour

atteindre environ 175 cellules à l'âge de 20 semaines (Figure 4).

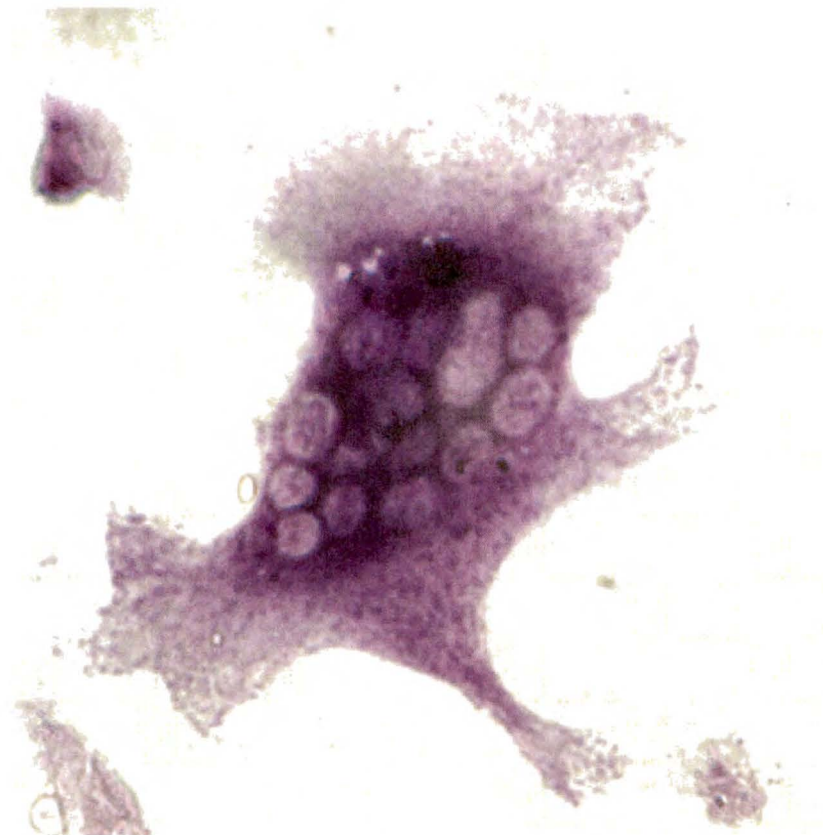


Figure 3. Expression de la phosphatase acide résistante au tartrate.

Cellule multinucléée ayant subi une coloration enzymatique pour révéler la présence de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP). La coloration rouge révèle la présence de la TRAP. Photo prise à l'aide d'un microscope inversé muni d'une lentille de 100 X couplé à une caméra numérique. La capture de l'image s'est faite avec le logiciel Spot. Grossissement : approximativement 1000 X.

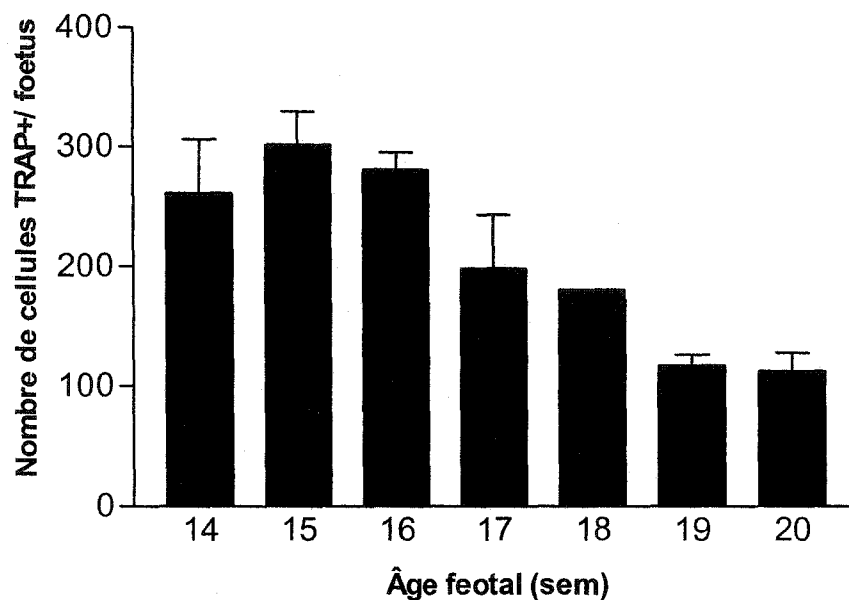


Figure 4. Nombres de cellules TRAP positives selon l'âge fœtal

Vingt-quatre heures après l'extraction, les cellules ont été fixées et colorées pour mettre en évidence les cellules TRAP positives. Le nombre de cellules TRAP positives multinucléées extraites par fœtus a été déterminé pour chaque âge de gestation (14 à 20 semaines). Pour chaque âge $n = 3$; sauf pour 18 sem où $n=1$. $p < 0.05$

12.2 Réponse à la calcitonine

La calcitonine a induit une augmentation du niveau de calcium intracellulaire chez les cellules multinucléées (Figure 5B). Le niveau de fluorescence est exprimé en pseudocouleur sur une échelle de 0 à 255 où 255 est le maximum de fluorescence. Après l'acquisition des données, une coloration nucléaire était effectuée pour s'assurer que les cellules étudiées étaient multinucléées (données non montrées).

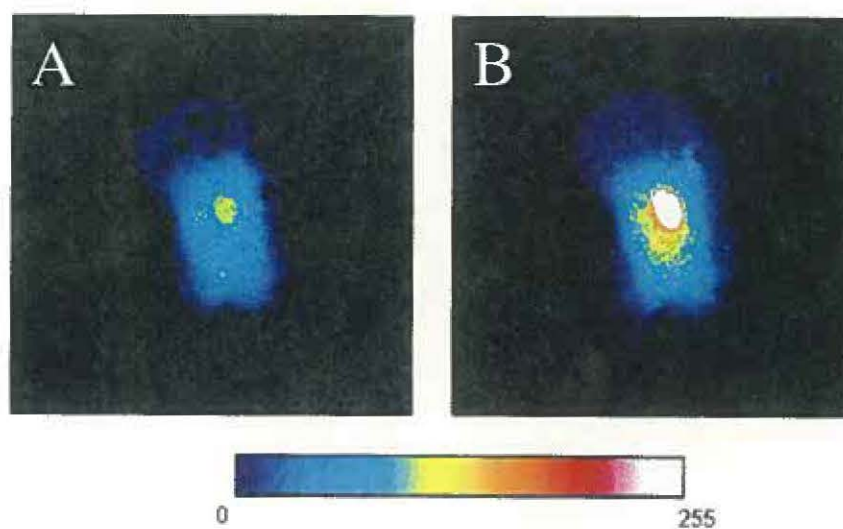


Figure 5. Effet de la calcitonine sur le niveau de calcium intracellulaire

Détermination du niveau de calcium intracellulaire utilisant la sonde calcique fluorescente Fluo-3 montrant une cellule multinucléée avant (A) et après (B) l'addition de 1 μ M de calcitonine humaine. La fluorescence est exprimée en pseudocouleur sur une échelle allant de 0 à 255, où 255 représente la fluorescence maximale. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle au niveau de calcium intracellulaire. Ces résultats sont représentatifs de 3 essais indépendants.

12.3 Résorption

La caractéristique principale des ostéoclastes est d'être capable de résorber l'os. Nous avons donc mis au point un essai qui nous a permis de vérifier la capacité de résorption osseuse des ostéoclastes retrouvés dans notre population. Plusieurs lacunes de résorption ont pu être observées sur des disques d'os bovins après 24 heures de culture (Figure 6), indiquant que les ostéoclastes présents dans la préparation étaient capables de résorber l'os. De plus, avec l'aide d'un système informatique, nous avons pu quantifier l'activité de résorption des ostéoclastes. Après 24 heures de culture sans traitement, l'aire de résorption totale moyenne était de $102 \pm 6.5 \text{ nm}^2$ par disque d'os et l'aire de résorption par ostéoclaste était de $0.55 \pm 0.05 \text{ nm}^2$. Lorsque les cellules étaient traitées avec $1 \mu\text{M}$ de calcitonine, l'aire totale de résorption a chuté à $20 \pm 4.3 \text{ nm}^2$ et l'aire de résorption par ostéoclaste à $0.25 \pm 0.07 \text{ nm}^2$ (Figure 7).

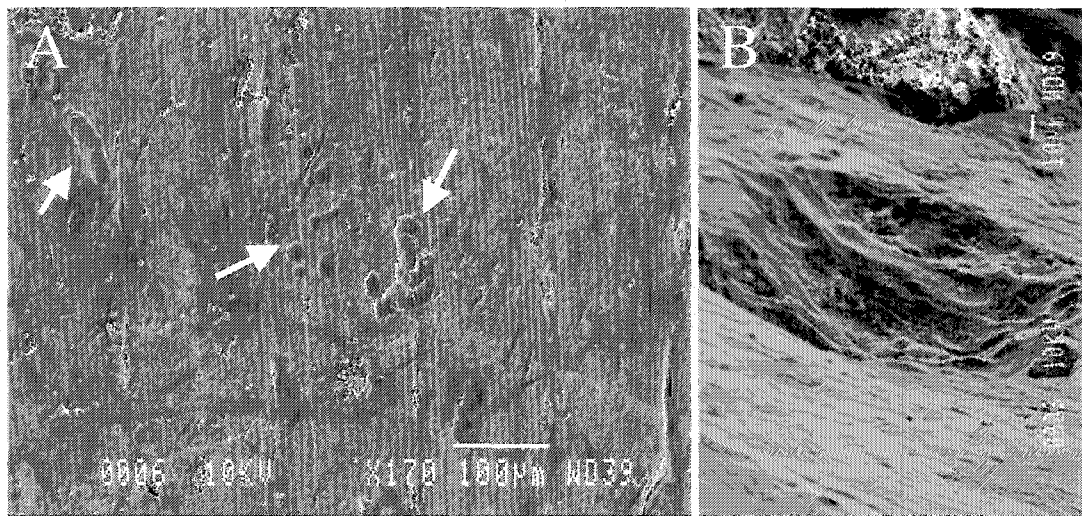


Figure 6. Résorption osseuse sur disque d'os bovins

Images de microscopie à balayage électronique montrant des puits de résorption effectués par les ostéoclastes sur des disques d'os bovins dévitalisés. A) Les flèches montrent des puits de résorption vus de haut. Barre = 100 µm. B) Puits de résorption observé avec un angle de 45 °. Barre = 10 µm.

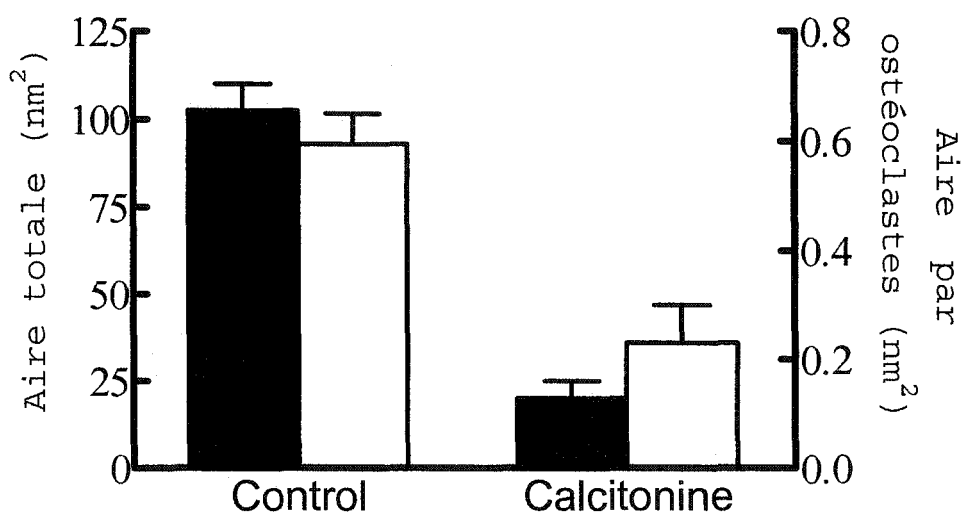


Figure 7. Effet de la calcitonine sur l'activité de résorption

Les cellules placées sur des disques d'os bovin ont été incubées 48 heures en présence de 1 μ m de calcitonine humaine et l'aire de résorption totale (barres pleines) et l'aire de résorption par ostéoclaste (barres vides) ont été déterminées. Les aires ont été calculées à l'aide du logiciel d'analyse d'image Mocha. n=3. Barres d'erreurs = S.E.M. $p < 0.05$

12.4 Formation des structures d'actine

Nous avons classifié les structures d'actine en trois catégories distinctes : anneaux d'actine, lamellipodes et podosomes. Nous avons appelé anneau d'actine les structures d'actine qui formaient un anneau dans la cellule (Figure 8); cette structure représente les ostéoclastes qui sont dans un état de résorption. Généralement, un ostéoclaste qui possède cette structure est dans un état immobile. Nous avons déterminé que 44.32 ± 6.82 % des cellules TRAP+ n'ayant subi aucun traitement possédaient l'anneau d'actine après 16 heures de culture. Les cellules n'ayant reçu aucun traitement, 16.25 ± 6.96 % des cellules possédaient des lamellipodes après 16 heures de culture (Figure 9). Nous avons retrouvé chez 34.56 ± 6.13 % des cellules TRAP+ des podosomes qui étaient répartis dans la cellule et qui ne formaient aucune structure particulière (Figure 10). Nous avons comptabilisé ces cellules dans la catégorie des podosomes.

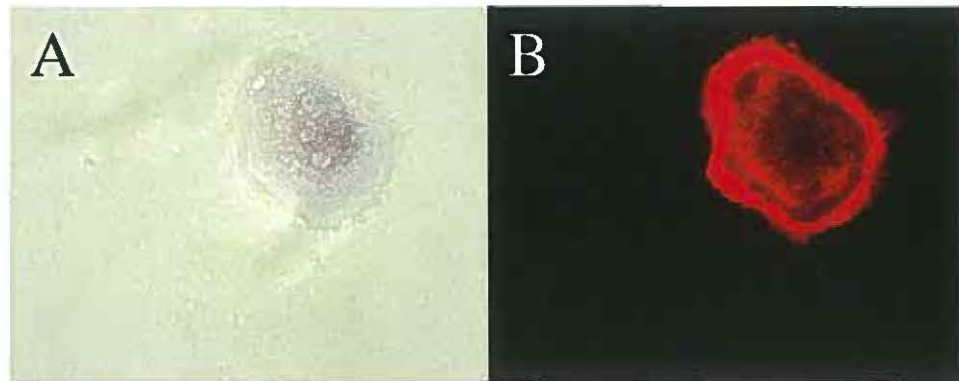


Figure 8. Présence d'un anneau d'actine chez une cellule multinucléée TRAP+

Vingt-quatre heures après l'extraction, les cellules fixées ont subi une coloration TRAP suivie d'une incubation avec la phalloïdine conjuguée à la rhodamine pour mettre en évidence les structures d'actine. A) Cellule multinucléée montrant une coloration rouge représentant la TRAP. B) Même cellule qu'en A observée en microscopie à fluorescence avec un filtre pour la rhodamine nous permettant de visualiser les structures d'actine. On observe en B la présence d'un anneau d'actine chez une cellule TRAP+ multinucléée. Grossissement = 400 x.

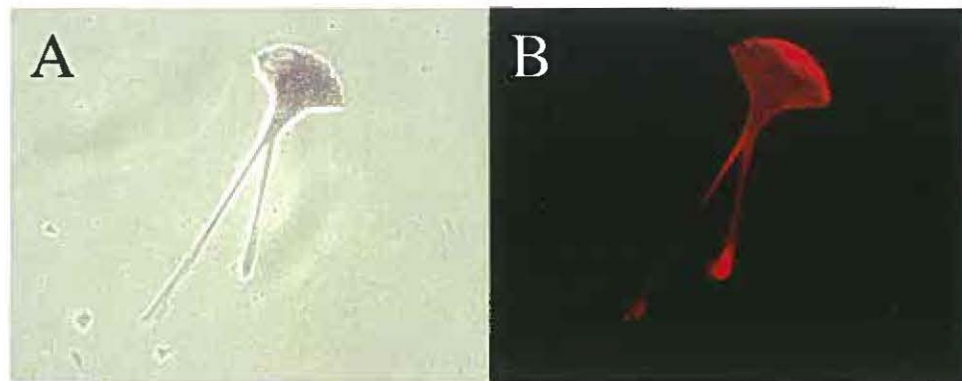


Figure 9. Présence de lamellipodes chez les ostéoclastes

Vingt-quatre heures après l'extraction, les cellules fixées ont subi une coloration TRAP suivie d'une incubation avec la phalloïdine conjuguée à la rhodamine pour mettre en évidence les structures d'actine. A) Cellule multinucléée montrant une coloration rouge représentant la TRAP. B) Même cellule qu'en A observée en microscopie à fluorescence avec un filtre pour la rhodamine nous permettant de visualiser les structures d'actine. On observe en B la présence de lamellipodes chez une cellule TRAP+ multinucléée. Grossissement = 400 x.

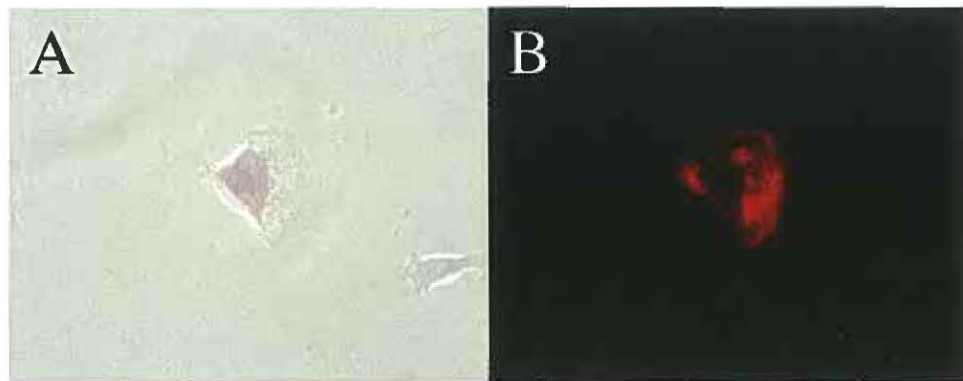


Figure 10. Présence de podosomes chez les ostéoclastes en culture

Vingt-quatre heures après l'extraction, les cellules fixées ont subi une coloration TRAP suivie d'une incubation avec la phalloïdine conjuguée à la rhodamine pour mettre en évidence les structures d'actine. A) Cellule multinucléée montrant une coloration rouge représentant la TRAP. B) Même cellule qu'en A observée en microscopie à fluorescence avec un filtre pour la rhodamine nous permettant de visualiser les structures d'actine. On observe en B une répartition des podosomes sans structure précise chez une cellule TRAP+ multinucléée. Grossissement = 400 x.

13 EXPRESSION DES CYCLOOXYGÉNASES

13.1 Expression de l'ARNm des cyclooxygénases

L'étude de l'expression de l'ARNm messager de la COX-1 et de la COX-2 faite par hybridation *in situ* en utilisant des sondes marquées à la digoxigénine a montré que les cellules multinucléées exprimaient les ARNm à la fois de la COX-1 (Figure 11A) et de la COX-2 (Figure 12A). Dans chacun des cas, le signal a été aboli par un traitement à la RNase A (Figure 11B et Figure 12B), montrant que le signal était dû à l'hybridation avec l'ARN. Des sondes non-complémentaires de longueurs identiques ont été utilisées comme contrôle négatif et n'ont produit aucun signal (Figure 11C et Figure 12C). Des hybridations n'ayant pas reçu d'anticorps anti-DIG ont été faites et n'ont produit aucun signal (Figure 11D et Figure 12D). En moyenne, les sondes dirigées contre les cyclooxygénases marquaient 80 % des cellules multinucléées examinées. Le signal observé pour la COX-1 est plus fort que celui observé pour la COX-2 mais il est important de noter que la procédure expérimentale utilisée ne permet pas de comparaison quantitative entre deux sondes différentes.

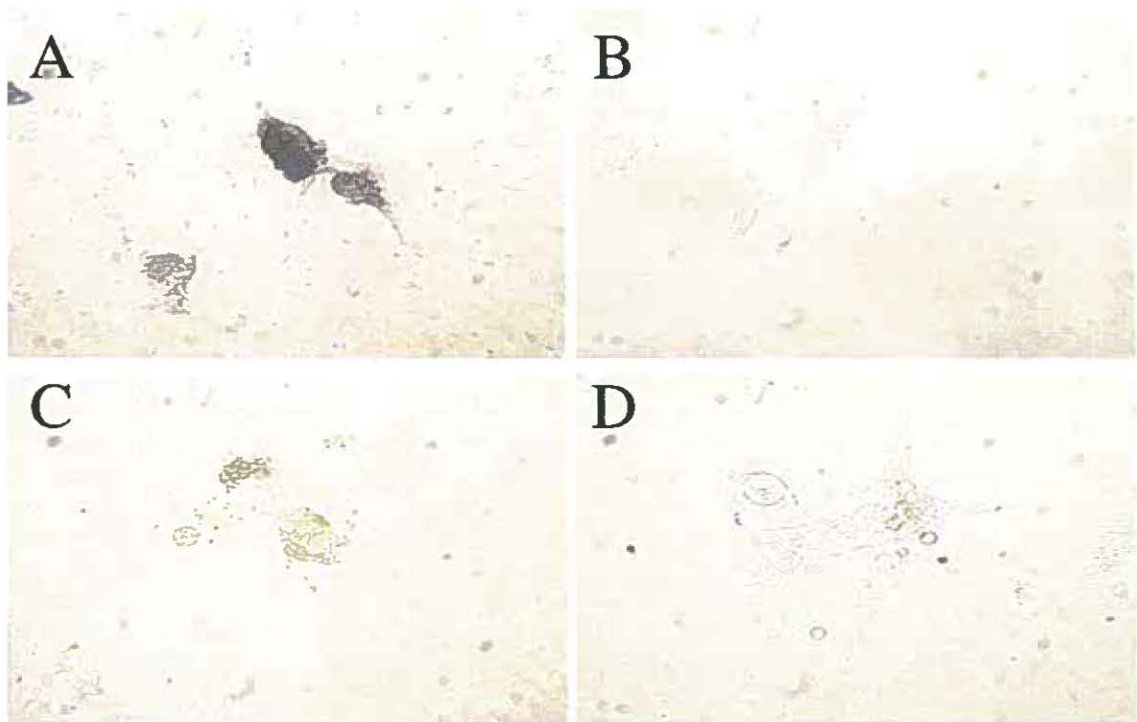


Figure 11. Hybridation in situ montrant l'expression de l'ARNm de la COX-1

Après 24 heures de culture, les ostéoclastes humains ont été incubés avec une sonde d'oligonucléotides complémentaires à l'ARNm de la COX-1 marquée à la Digoxigénine (5'-tgtgctcacgtagccagagcgtggcataca-3') (A). Comme contrôle, un traitement à la RNase A a été effectué avant l'incubation de la sonde complémentaire (B). De plus, une hybridation sans la présence de l'anticorps anti-Dig a été effectuée (C) ainsi qu'une hybridation avec la sonde non complémentaire pour la COX-1 (5'-acataccgtgcgagaccgatgcactcgtgt-3') (D). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins 3 expériences. Grossissement = 100x

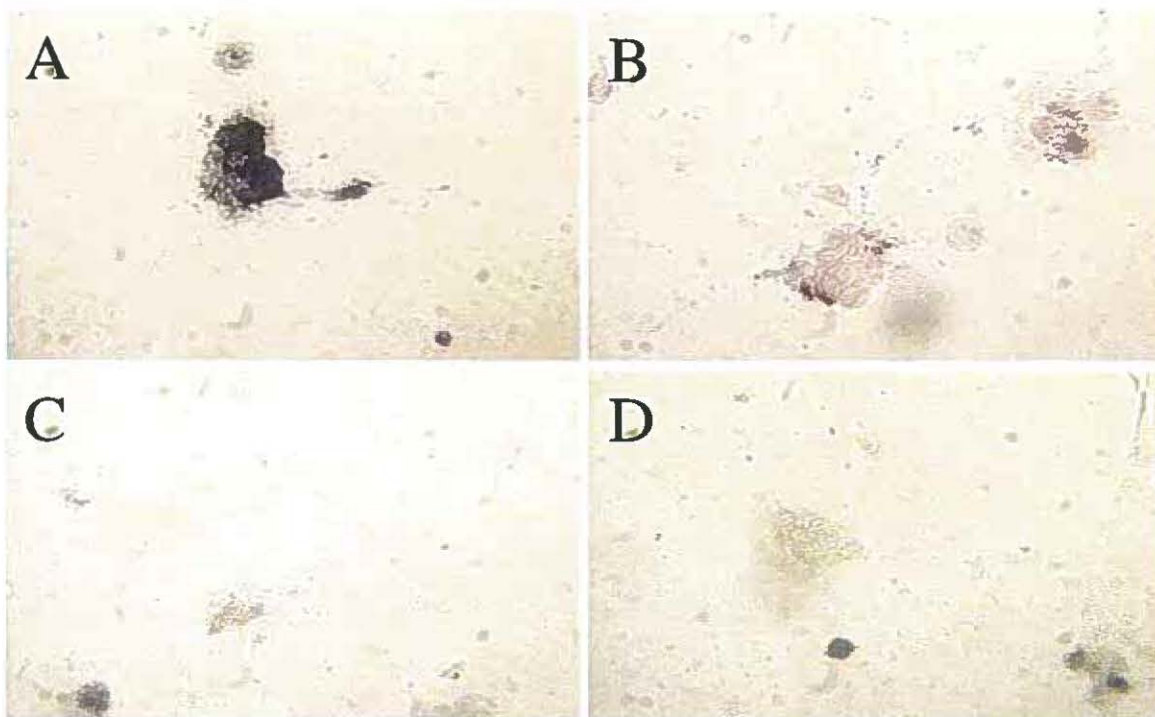


Figure 12. Hybridation in situ montrant l'expression de l'ARNm de la COX-2

Après 24 heures de culture, les ostéoclastes humains ont été incubés avec une sonde d'oligonucléotides complémentaires à l'ARNm de la COX-2 marquée à la Digoxigénine (5'-cctatcagtattagcctgcttgctgg-3') (A). Comme contrôle, un traitement à la RNase A a été effectué avant l'incubation de la sonde complémentaire (B). De plus, une hybridation sans la présence de l'anticorps anti-Dig a été effectuée (C) ainsi qu'une hybridation avec la sonde non complémentaire pour la COX-2 (5'-ggctgtgtcgtccgattatgactatcc-3') (D). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins 3 expériences. Grossissement = 100x

13.2 Expression des protéines des cyclooxygénases

Les immunohistochimies faites avec des anticorps anti-COX-1 et anti-COX-2 ont montré que les cellules multinucléées exprimaient les deux isoenzymes à des localisations différentes. Le signal obtenu avec l'anticorps dirigé contre la COX-1 était majoritairement cytoplasmique (Figure 13) tandis que le signal obtenu avec l'anticorps dirigé contre la COX-2 était majoritairement périnucléaire (Figure 14). Dans les deux cas, en absence des anticorps primaires, aucun signal n'a pu être observé.



Figure 13. Expression de la COX-1 tel que démontrée par immunohistochimie.

Les ostéoclastes humains ont été incubés avec un anticorps de souris anti-COX-1 humaine et la réaction a été révélée avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase. Le signal observé est majoritairement cytoplasmique. Le résultat présenté est représentatif d'au moins 3 expériences. Grossissement = 100x



Figure 14. Expression de la COX-2 tel que démontrée par immunohistochimie.

Les ostéoclastes humains ont été incubés avec un anticorps de souris anti-COX-2 humaine et la réaction a été révélée avec un anticorps anti-IgG de souris couplé à la peroxydase. Le signal observé est majoritairement périnucléaire.. Le résultat présenté est représentatif d'au moins 3 expériences. Grossissement = 400x

13.3 Activité cyclooxygénase

Après avoir démontré la présence de l'ARNm et de la protéine des cyclooxygénases-1 et -2 chez les cellules multinucléées présentes dans la préparation, l'activité enzymatique a été déterminée. Étant donné que la culture cellulaire obtenue était très hétérogène, nous avons adapté une méthode qui permettait d'évaluer l'activité des cyclooxygénases dans une seule cellule. Nous avons d'abord ajusté les conditions avec un modèle connu. Comme contrôle positif, nous avons utilisé les cellules NIH-3T3 qui ont la particularité d'exprimer les deux isoformes de la cyclooxygénase.

Les cellules NIH-3T3 expriment de façon constitutive la COX-1 et il est possible d'induire l'expression de la COX-2 avec différents traitements dont la stimulation à l'interleukine-1 (Morita *et al*, 1995). Les cellules NIH-3T3 ont été traitées avec 100 U/ml d'interleukine-1 pendant 3 heures pour induire l'expression de la COX-2 et chargées avec le marqueur fluorescent H₂DCFDA qui permet de détecter l'activité des cyclooxygénases.

Les cellules ont subi un double marquage, les noyaux étant colorés en rouge et la fluorescence du H₂DCFDA apparaissant en vert. Les cellules NIH-3T3 pré-traitées avec le véhicule ne montraient aucune fluorescence de base mais l'addition de 30 μ M d'acide arachidonique a induit une forte augmentation du signal. L'indométhacine (inhibiteur de COX1 et COX2) a aboli le signal induit par l'acide arachidonique et le DFU (inhibiteur COX-2) a grandement diminué mais n'a pas complètement éliminé l'effet de l'acide arachidonique (Figure 15). D'après les résultats obtenus avec les NIH-3T3, cette méthode nous permet de caractériser

l'activité enzymatique des cyclooxygénases chez des cellules isolées et de départager l'activité de la COX-1 et de la COX-2. Après avoir validé l'approche expérimentale avec les NIH-3T3, nous avons étudié l'activité cyclooxygénase chez les ostéoclastes humains en culture (Figure 16). Tout comme les NIH-3T3, les ostéoclastes ont été soumis à un double marquage où l'on retrouve les noyaux en rouge et l'activité COX en vert. Les cellules multinucléées pré-traitées avec le véhicule montraient un taux de fluorescence basal élevé et aucune augmentation du signal n'a été observée suite à l'addition de l'acide arachidonique. Chez les cellules pré-traitées avec 2 μ M d'indométhacine, concentration à laquelle COX-1 et COX-2 sont inhibées complètement (Lora *et al*, 1998), le niveau basal de fluorescence a été aboli et aucun effet de l'acide arachidonique n'a été détecté dans ces conditions expérimentales. Pour déterminer la contribution de COX-2 dans la fluorescence observée, les cellules ont été pré-traitées avec 22 μ M DFU (5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl)-4-(4-methylsulphonyl)phenyl-2(5H)-furanone). Le DFU possède un IC_{50} de 41 nM contre la COX-2 et de 50 μ M contre la COX-1 (Riendeau *et al*, 1997). Donc, à la concentration utilisée, le DFU est un inhibiteur sélectif de la COX-2. Les cellules pré-traitées avec le DFU possédaient un faible niveau basal de fluorescence et l'addition de l'acide arachidonique a légèrement augmenté le signal.

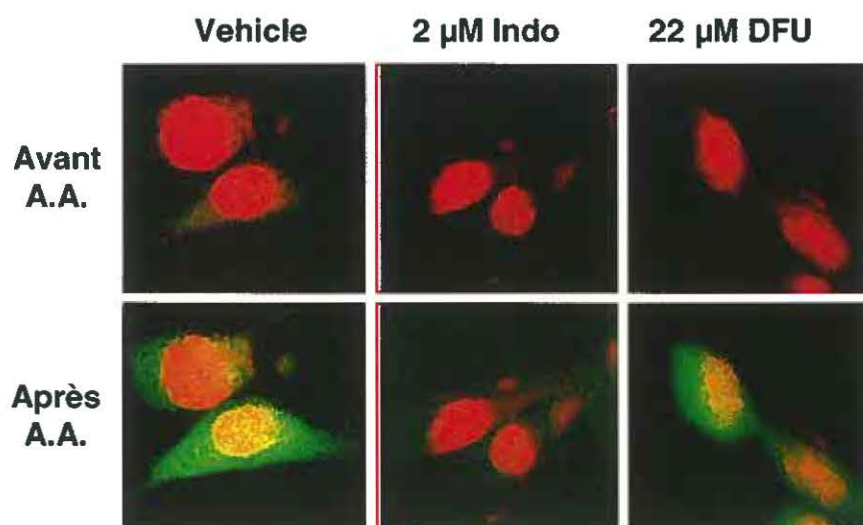


Figure 15. Activité cyclooxygénase chez les cellules NIH-3T3.

Images de microscopie confocale montrant les NIH-3T3 stimulées 3 heures avec 100 U/ml d'IL-1 α . L'utilisation du marqueur nucléaire SYTO-59 permet la visualisation des noyaux (rouge) et l'activité cyclooxygénase est évaluée grâce à la sonde H₂DCFDA (vert). Les cellules ont été pré-traitées avec le véhicule, 2 μ M indométhacine ou 22 μ M DFU pendant 45 minutes et ensuite chargées avec la sonde H₂DCFDA et le marqueur SYTO-59. La fluorescence basale a été observée et enregistrée (première rangée de chaque série), ensuite 30 μ M d'acide arachidonique ont été ajoutés et le niveau de fluorescence a été observé après 1 minute (deuxième rangée de chaque série). La deuxième et la troisième colonne montrent respectivement les NIH-3T3 pré-traitées avec 2 μ M indométhacine, un inhibiteur non spécifique COX-1/COX-2, et 22 μ M DFU, un inhibiteur spécifique de COX-2. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

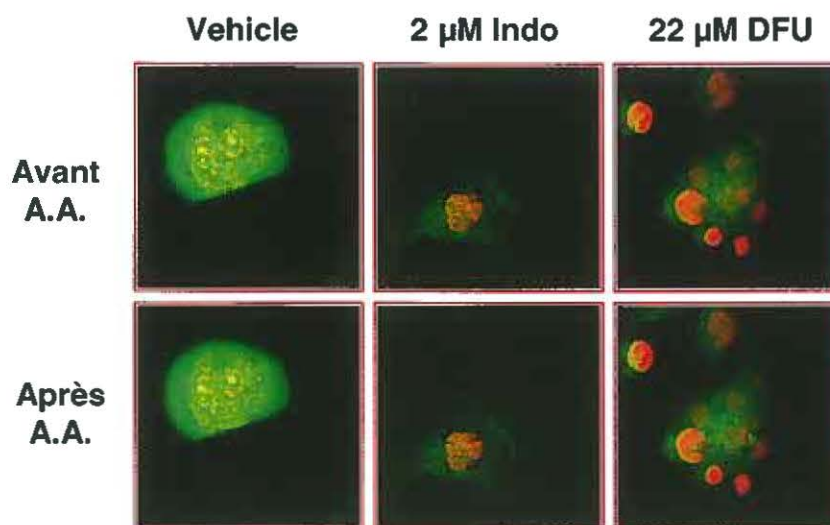


Figure 16. Activité cyclooxygénase chez les ostéoclastes

Images de microscopie confocale montrant les ostéoclastes humains matures 24 heures après l'extraction des cellules. L'utilisation du marqueur nucléaire SYTO-59 permet la visualisation des noyaux (rouge) et l'activité cyclooxygénase est évaluée grâce à la sonde H_2DCFDA (vert). Les cellules ont été pré-traitées avec le véhicule, 2 μM indométhacine ou 22 μM DFU pendant 45 minutes et ensuite chargées avec la sonde H_2DCFDA et le marqueur SYTO-59. La fluorescence basale a été observée et enregistrée (première rangée de chaque série), ensuite 30 μM d'acide arachidonique ont été ajoutés et le niveau de fluorescence a été observé après 1 minute (deuxième rangée de chaque série). La deuxième et la troisième colonne montrent respectivement les ostéoclastes humains pré-traités avec 2 μM indométhacine, un inhibiteur non spécifique COX-1/COX-2, et 22 μM DFU, un inhibiteur spécifique de COX-2. Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences.

14 EXPRESSION DES RÉCEPTEURS AUX PROSTAGLANDINES

Le second volet de l'étude était de caractériser l'expression des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes humains matures. Pour atteindre cet objectif, il fallait une fois de plus utiliser des méthodes qui nous permettaient l'étude d'une seule cellule dans une population de cellules hétérogène. Une approche semblable à celle utilisée pour caractériser l'expression des cyclooxygénases a été développée. L'expression de l'ARNm des récepteurs a été déterminée à l'aide de l'hybridation *in situ* tandis que l'expression de la protéine a été démontrée avec l'immunohistochimie.

14.1 Expression des ARN messagers des récepteurs aux prostaglandines

L'étude de l'expression des ARN messagers des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes humains a été effectuée par hybridation *in situ* en utilisant des sondes oligonucléotidiques marquées à la digoxigénine. L'hybridation *in situ* a permis de démontrer que les seuls récepteurs de type EP exprimés chez les ostéoclastes humains en culture étaient les sous-types EP₃ (Figure 17A) et EP₄ (Figure 18A). Dans les conditions expérimentales utilisées, les ARN messagers des sous-types EP₁ et EP₂ n'ont pas été détectés. Pour chaque ARNm exprimé, un traitement à la RNase A a aboli le signal (Figure 17B et Figure 18B), montrant ainsi la spécificité de l'hybridation à l'ARN. Un contrôle négatif a été effectué en utilisant des sondes de même longueur construites avec les séquences non-complémentaires et aucun signal n'a été obtenu (Figure 17C et Figure 18C).

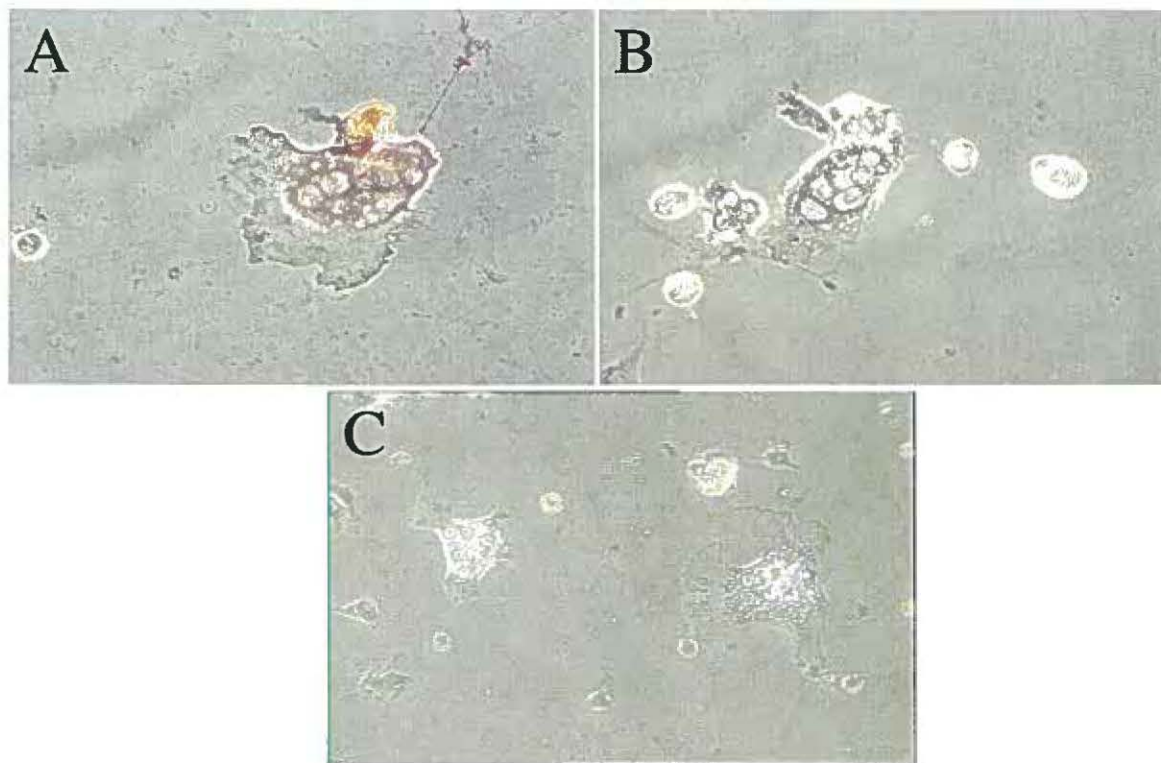


Figure 17. Hybridation in situ montrant l'ARN messenger du récepteur EP₃

Après 24 heures de culture, les ostéoclastes humains ont été incubés avec une sonde d'oligonucléotides complémentaire à l'ARNm du récepteur EP₃ marquée à la Digoxigénine (5'-acattgatccccataagctgaatggccgtctcggtcgtgat-3') (A). Comme contrôle, un traitement à la RNase A a été effectué avant l'incubation de la sonde complémentaire (B). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins 3 expériences. Grossissement = 100x

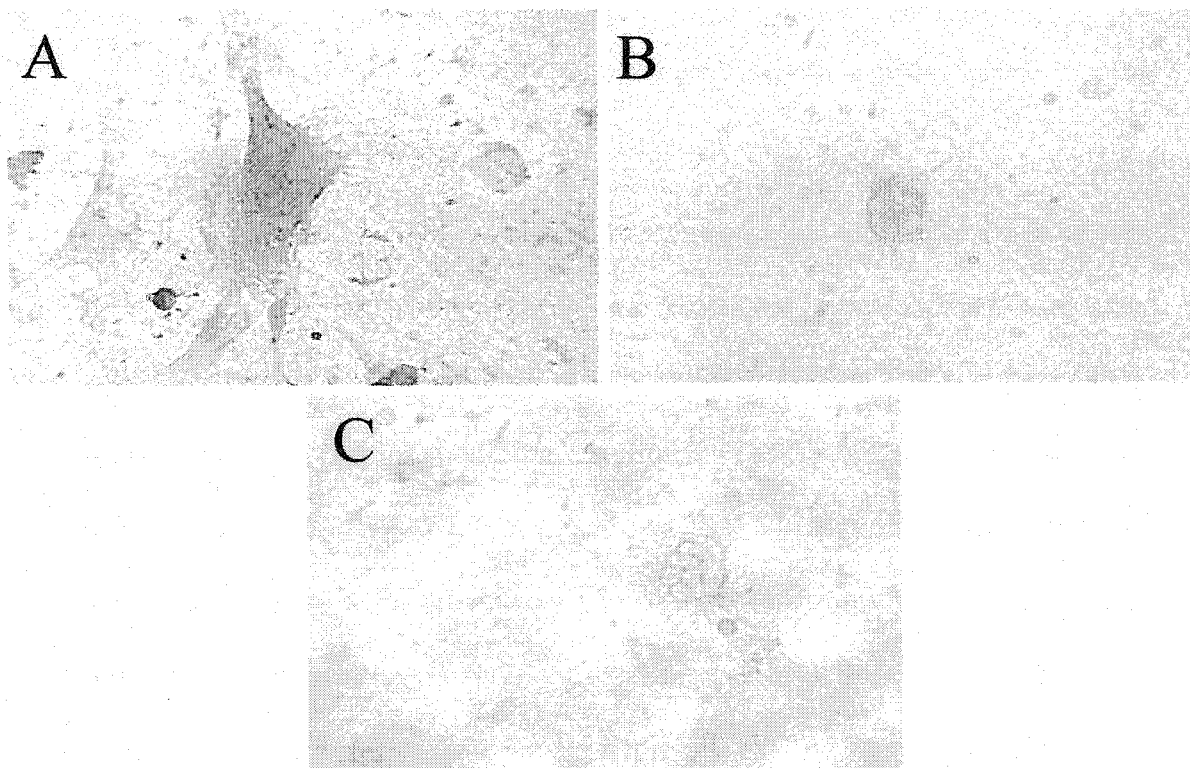


Figure 18. Hybridation in situ montrant l'ARN messenger du récepteur EP₄

Après 24 heures de culture, les ostéoclastes humains ont été incubés avec une sonde d'oligonucléotides complémentaire à l'ARNm du récepteur EP₄ marquée à la Digoxigénine (5'-ggcagaagatgtcctttgactgtctgagcagtgtgtccg-3') (A). Comme contrôle, un traitement à la RNase A a été effectué avant l'incubation de la sonde complémentaire (B). Les résultats montrés sont représentatifs d'au moins 3 expériences. Grossissement = 100x

14.2 Expression des protéines des récepteurs aux prostaglandines

L'étude de l'expression des protéines des récepteurs aux prostaglandines de type EP a été effectuée par immunohistochimie. Seules les immunohistochimies faites avec les anticorps anti-EP₃ (Figure 19A) et anti-EP₄ (Figure 20A) ont produit des signaux positifs. Dans les conditions expérimentales utilisées, aucun signal n'a été détecté pour les sous-types EP₁ et EP₂. Pour chaque immunohistochimie positive, un contrôle négatif a été effectué en adsorbant les anticorps anti-récepteurs avec leur peptide respectif ayant servi à l'immunisation des lapins. L'adsorption des anticorps a complètement aboli le signal produit par l'anticorps anti-EP₃ (Figure 19B) et pour l'anticorps anti-EP₄ (Figure 20B), montrant ainsi la spécificité des anticorps.

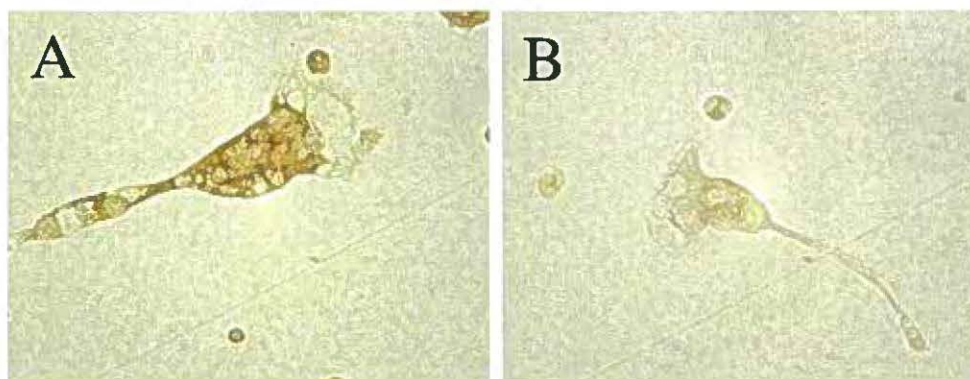


Figure 19. Immunohistochimie dirigée contre le récepteur EP₃

Les ostéoclastes humains ont été incubés avec un anticorps de lapin dirigé contre le récepteur EP₃ humain et la réaction a été révélée avec un anticorps anti-IgG de lapin qui a été couplé à la peroxydase. Le signal observé est majoritairement cytoplasmique (A). Le signal a été aboli lorsque l'anticorps anti-EP₃ a été adsorbé avec un peptide du récepteur EP₃. Le résultat montré est représentatif d'au moins 3 expériences. Grossissement = 400x

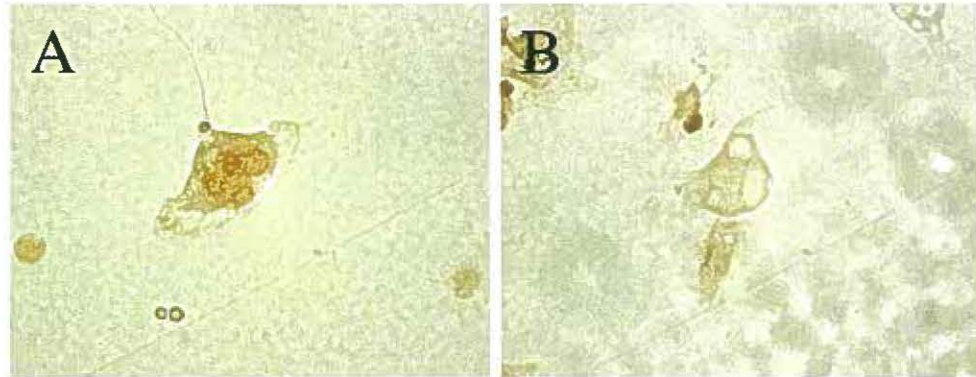


Figure 20. Immunohistochimie dirigée contre le récepteur EP₄

Les ostéoclastes humains ont été incubés avec un anticorps de lapin dirigé contre le récepteur EP₄ humain et la réaction a été révélée avec un anticorps anti-IgG de lapin qui a été couplé à la peroxydase. Le signal observé est majoritairement nucléaire (A). Le signal a été aboli lorsque l'anticorps anti-EP₄ a été adsorbé avec un peptide du récepteur EP₄. Le résultat montré est représentatif d'au moins 3 expériences. Grossissement = 400x

15 EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES RÉCEPTEURS

Après avoir déterminé quels étaient les récepteurs aux prostaglandines exprimés chez les ostéoclastes humains en culture, nous avons voulu déterminer si ces récepteurs avaient des effets sur la physiologie des ostéoclastes. Les essais de résorption osseuse *in vitro* étant très peu reproductibles, nous avons entrepris l'étude des effets des récepteurs aux prostaglandines sur l'organisation des structures d'actine. Cette approche expérimentale est non seulement plus simple et plus reproductible mais elle nous permet aussi d'étudier à la fois l'état d'activation et la mobilité, deux paramètres importants chez les ostéoclastes. Suite à l'extraction des ostéoclastes, le pourcentage de cellules possédant un anneau d'actine augmentait en fonction du temps pour se stabiliser aux alentours de 44 % après 9 heures de culture (Figure 21). Cependant, le remaniement des structures d'actine est un phénomène rapide très sensible aux changements de conditions de culture. Vingt-quatre heures après l'extraction, l'ajout de 2 μ l du véhicule (éthanol) (Figure 22 barres vides) a déstabilisé les structures d'actine et abaissé le pourcentage des cellules TRAP+ possédant un anneau d'actine à 24.2 ± 0.7 % après 5 minutes de stimulation. Trente minutes après la stimulation, 62.5 ± 4.2 % des cellules TRAP+ possédaient un anneau d'actine. Parallèlement, nous avons traité les cellules avec 2 mM de calcium (Figure 22, barres hachurées). Le calcium utilisé à cette concentration est un inhibiteur connu de la formation de l'anneau d'actine. Le calcium a fait chuter le pourcentage d'ostéoclastes possédant un anneau d'actine à 10.5 ± 0.5 % au bout de 5 minutes de stimulation. Aucune différence significative n'a été observée au niveau de ce pourcentage pour les

temps de stimulation allant jusqu'à 30 minutes, montrant ainsi le caractère permanent de l'inhibition faite par le calcium. La stimulation avec la 11-déoxy-PGE₁ (Figure 22, barres pleines) pendant 5 minutes a abaissé le pourcentage de cellules TRAP+ possédant un anneau d'actine à 1.5 ± 0.5 %, ce qui représente une diminution de 94 % comparativement au contrôle. La diminution provoquée par la 11-déoxy-PGE₁ après 10 et 30 minutes de stimulation était beaucoup moins prononcée, représentant seulement des baisses de 23.3 % et 15.6 % respectivement. Ce résultat met en évidence une réponse transitoire à la 11-déoxy-PGE₁ où l'effet maximal est retrouvé après 5 minutes de stimulation. Nous avons donc choisi de stimuler les cellules pendant 5 minutes pour être en mesure d'observer l'effet maximal des prostaglandines sur les structures d'actine. Lorsque les cellules ont été stimulées avec des doses croissantes de PGE₂, seule la formation de l'anneau d'actine a été influencée de manière significative montrant une diminution concentration-dépendante avec un EC₅₀ de 1.09 ± 1.2 nM du pourcentage de cellules TRAP+ possédant un anneau d'actine (Figure 23). Aucun effet significatif n'a été observé sur la formation de lamellipodes et de podosomes. Pour déterminer quels sont les sous-types du récepteur EP impliqués dans l'effet observé avec la PGE₂, nous avons stimulé les cellules avec des agonistes sélectifs pour les différents sous-types EP. La stimulation des cellules avec la 11-déoxy-PGE₁, un agoniste sélectif de EP₂ et EP₄, a eu pour effet de diminuer de manière concentration-dépendante le pourcentage d'ostéoclastes possédant un anneau d'actine (EC₅₀: 14.3 ± 2.8 nM) (Figure 24). D'autre part, la 11-déoxy-PGE₁ a induit une augmentation concentration-dépendante du pourcentage d'ostéoclastes

montrant des podosomes ($EC_{50} : 1.6 \pm 1.9 \text{ nM}$). La 11-déoxy-PGE₁ n'a eu aucun effet observable sur la formation de lamellipodes chez les ostéoclastes. Pour être en mesure de déterminer quel sous-type de récepteur entre EP₂ et EP₄ était responsable de l'effet produit par la 11-déoxy-PGE₁, nous avons stimulé les cellules avec le butaprost. Le butaprost est un agoniste sélectif pour le sous-type EP₂. Aucun des paramètres observés n'a été influencé par le butaprost (Figure 25). L'incapacité du butaprost à influencer l'organisation des structures d'actine suggère que l'action de la 11-déoxy-PGE₁ est produite par le récepteur EP₄. Le misoprostol, un agoniste sélectif pour les sous-type EP₂ et EP₃, n'a eu aucun effet sur la formation de l'anneau d'actine mais il a provoqué une baisse significative du pourcentage d'ostéoclastes montrant des lamellipodes (Figure 26). Nous avons aussi observé une augmentation du nombre d'ostéoclastes qui montraient des podosomes. Les EC_{50} des courbes concentration-réponse pour les lamellipodes et les podosomes sont de $4.2 \pm 1.5 \text{ nM}$ et $1.7 \pm 2.1 \text{ nM}$ respectivement.

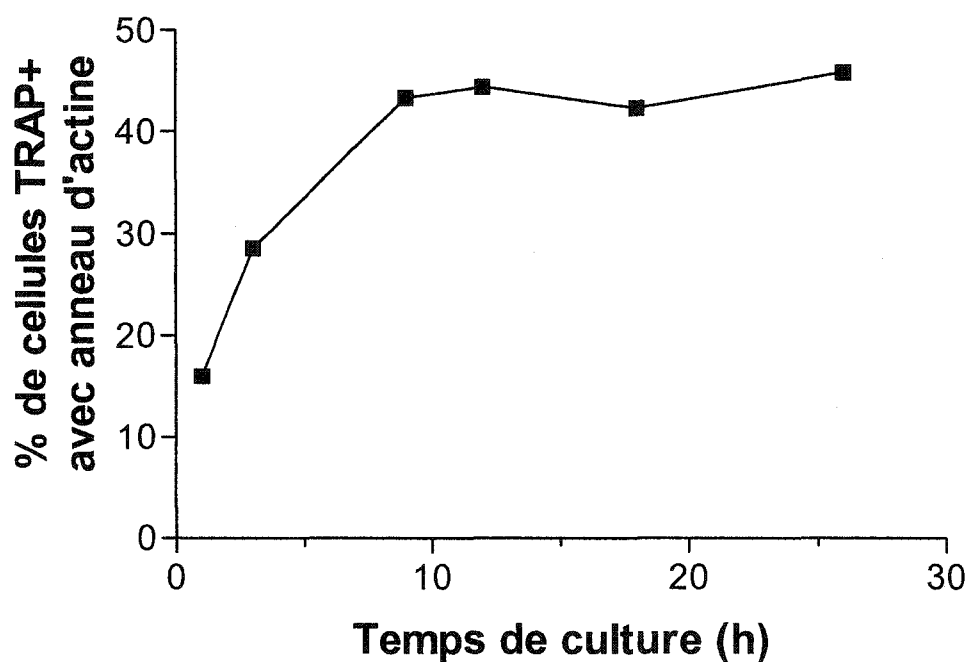


Figure 21. Formation des anneaux d'actine en fonction du temps

Les ostéoclastes isolés fixés à différents temps (1,3,9,12,18 et 24 heures) ont subi une coloration enzymatique pour détecter la TRAP et ont été incubés en présence de phalloïdine conjuguée à la rhodamine. Le pourcentage de cellules TRAP+ possédant un anneau d'actine a été établi pour chaque temps en observant les cellules en microscopie à fluorescence avec un filtre pour la rhodamine. Après 9 heures de culture, le pourcentage d'ostéoclastes possédant un anneau d'actine se stabilise aux environs de 45 %. Cette observation provient d'une seule expérience faite avec un fœtus de 18 semaines de gestation.

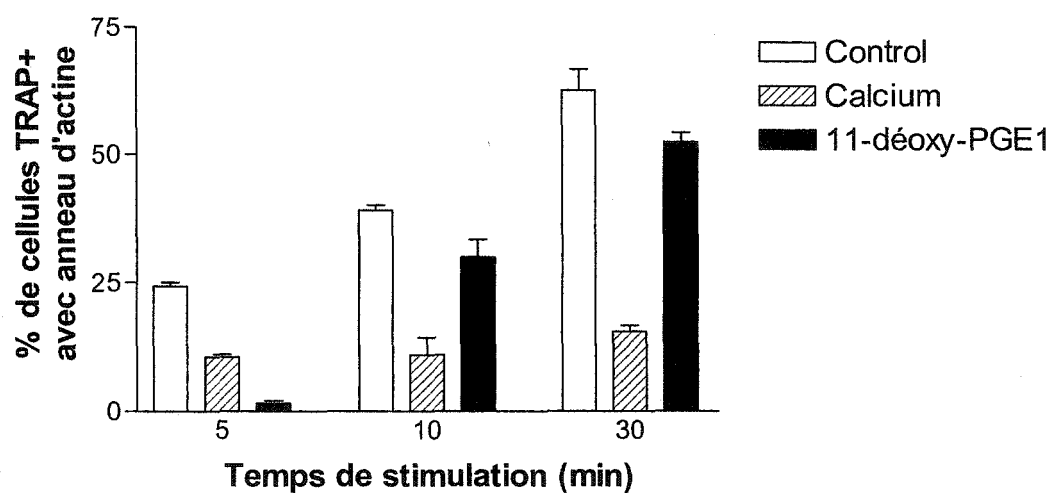


Figure 22. Détermination du temps de stimulation optimal

Les ostéoclastes humains pré-incubés avec 2 μM indométhacine ont été stimulés avec le véhicule (barres vides), 40 mM de calcium (barres hachurées) ou 1 μM de 11-déoxy-PGE₁ (barres pleines) pendant 5, 10 ou 30 minutes. Les cellules ont été fixées et colorées avec la trousse de détection de la TRAP pour être ensuite incubées avec la phalloïdine-rhodamine pour visualiser les structures d'actine. Le pourcentage de cellule TRAP+ avec un anneau d'actine a ensuite été déterminé pour chaque condition. La réponse optimale de la 11-déoxy-PGE₁ a été observée à 5 minutes. $n=3$. $p < 0.05$

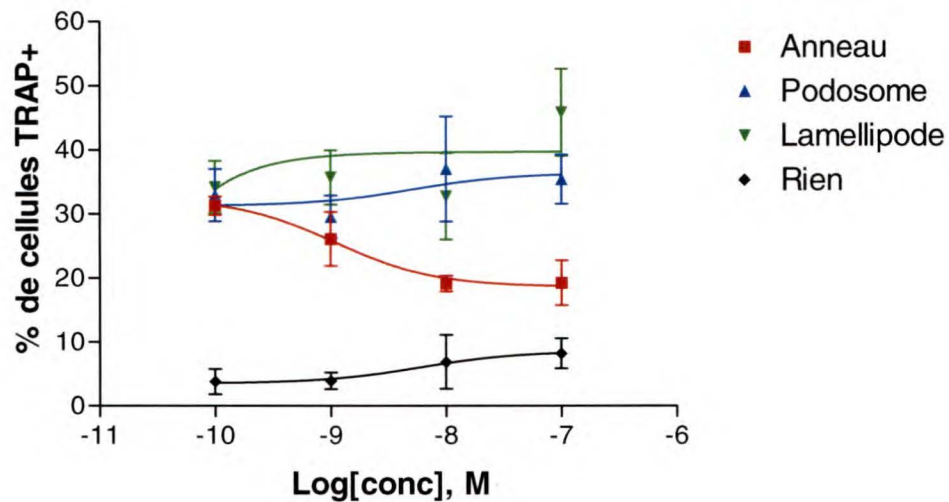


Figure 23. Effet de la PGE₂ sur les structures d'actine

Les cellules pré-traitées avec 2 μ M indométhacine ont été stimulées pendant 5 minutes avec différentes concentrations de PGE₂. La PGE₂ a provoqué une diminution du pourcentage de cellules TRAP+ avec un anneau d'actine (■). Aucun effet significatif n'a été observé sur le pourcentage de cellules montrant des lamellipodes (▼) et des podosomes (▲). Le pourcentage de cellules ne montrant aucune structure (◆) a légèrement augmenté mais cette augmentation n'est pas significative. Les barres d'erreurs représentent le S.E.M. n=3. p < 0.05.

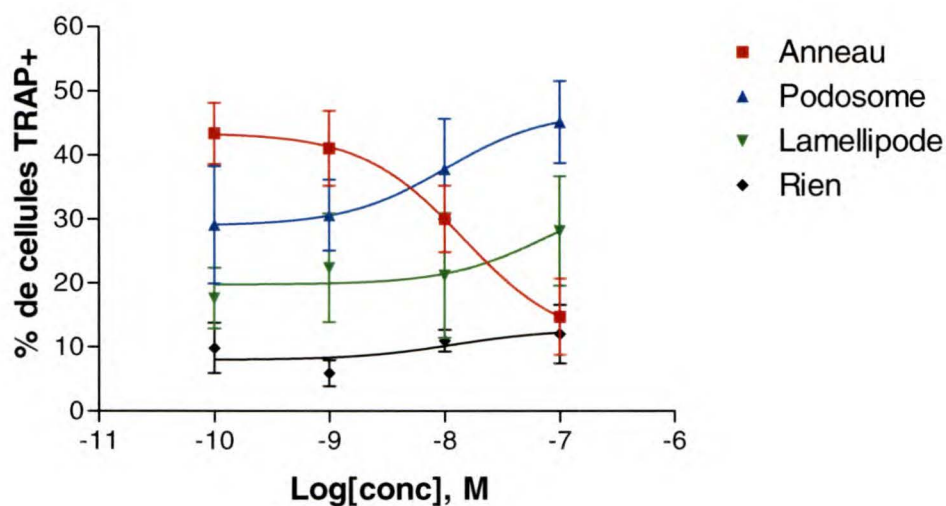


Figure 24. Effet de la 11-déoxy-PGE₁ sur les structures d'actine

Les cellules pré-traitées avec 2 μ M indométhacine ont été stimulées pendant 5 minutes avec différentes concentrations de 11-déoxy-PGE₁, un agoniste EP₂/EP₄. La 11-déoxy-PGE₁ a provoqué une forte diminution du pourcentage de cellules TRAP+ avec un anneau d'actine (■) et une augmentation du pourcentage de cellules montrant des podosomes (▲). Aucun effet significatif n'a été observé sur les pourcentages de cellules montrant des lamellipodes (▼) et celles ne montrant aucune structure (◆). Les barres d'erreurs représentent le S.E.M. n=3. p < 0.05.

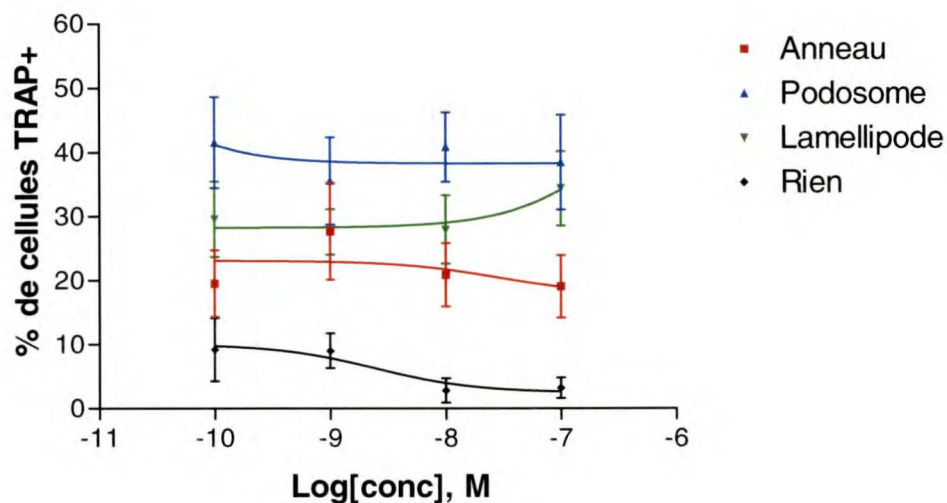


Figure 25. Effet du Butaprost sur les structures d'actine

Les cellules pré-traitées avec 2 μ M indométhacine ont été stimulées pendant 5 minutes avec différentes concentrations de Butaprost, un agoniste du récepteur EP₂. Le butaprost n'a provoqué aucun effet sur les structures d'actine observées. Aucun changement significatif n'a été observé sur le pourcentage de cellules TRAP+ montrant soit un anneau d'actine (■), des lamellipodes (▼), des podosomes (▲) ou aucune structure (◆). Les barres d'erreurs représentent le S.E.M. n=3. p < 0.05.

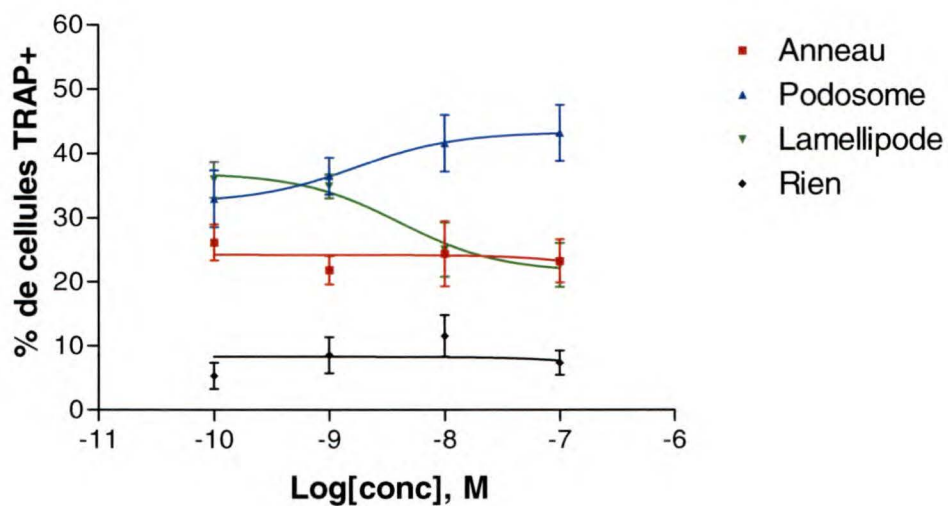


Figure 26. Effet du misoprostol sur les structures d'actine

Les cellules pré-traitées avec 2 μ M indométhacine ont été stimulées pendant 5 minutes avec différentes concentrations de misoprostol, un agoniste des récepteurs EP_2/EP_3 . Le misoprostol a provoqué une diminution du pourcentage de cellules TRAP+ montrant des lamellipodes (\blacktriangledown) et une augmentation du pourcentage de cellules montrant des podosomes (\blacktriangle). Aucun effet significatif n'a été observé sur le pourcentage de cellules montrant un anneau d'actine (\blacksquare) ni sur le pourcentage de cellules ne montrant aucune structure (\blacklozenge). Les barres d'erreurs représentent le S.E.M. n=3. p < 0.05.

DISCUSSION

Les objectifs de cette étude étaient de caractériser l'expression des cyclooxygénases et des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes humains en culture. Pour être en mesure d'atteindre ces objectifs, il a fallu mettre au point un nouveau modèle d'ostéoclastes humains matures en culture. Bien qu'il existe plusieurs modèles qui permettent l'étude des ostéoclastes humains, ces autres modèles exigent l'utilisation du M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) et du RANKL (*receptor activated NFκB ligand*) pour différencier les précurseurs ostéoclastiques du sang périphérique ou de la moelle osseuse (Sarma *et al*, 1996; Matsuzaki *et al*, 1998). La majorité de ces protocoles exigent aussi l'utilisation de la dexaméthasone (Quinn *et al*, 1998; Breuil *et al*, 1998; Yasuda *et al*, 1999; Atkins *et al*, 2000), ce qui peut avoir un impact majeur sur l'expression des cyclooxygénases, ce que nous voulions éviter dans cette étude. De plus, il a été aussi démontré que les ostéoclastes différenciés *in vitro* répondent différemment à l'IL-1 (Fox *et al*, 2000), suggérant que le comportement des ostéoclastes différenciés *in vitro* peut différer des ostéoclastes retrouvés *in vivo* et *ex vivo* (Fox *et al*, 2000). Pour ces raisons, nous avons décidé d'utiliser un modèle d'ostéoclastes matures authentiques. Cependant, l'étude des ostéoclastes matures authentiques est entravée par plusieurs limitations telles que la source de cellules, la durée de vie *in vitro* des ostéoclastes, l'hétérogénéité des types cellulaires dans la préparation et les différences inter-espèces. Les os normaux possèdent un nombre relativement faible d'ostéoclastes et le nombre de cellules isolées de ce tissu est trop faible pour permettre leur étude. Dans certaines conditions

pathologiques telles que l'ostéoporose et la maladie de Paget, on retrouve un grand nombre d'ostéoclastes qui peuvent être isolés. Par contre, ces ostéoclastes peuvent ne pas être représentatifs des ostéoclastes normaux et la distribution des cyclooxygénases et des récepteurs aux prostaglandines peut être altérée par le processus pathologique. Pour mettre au point un modèle d'ostéoclastes humains matures authentiques, nous avons décidé d'extraire les cellules à partir de tissus fœtaux. Les os fœtaux possèdent un très haut taux de remaniement osseux et on y retrouve un nombre élevé d'ostéoclastes. Nous avons appliqué sur les longs os fœtaux humains une méthode décrite par Chambers *et al.* (Chambers *et al.*, 1982) pour extraire des ostéoclastes de lapin.

Pour caractériser notre système de culture cellulaire, nous avons vérifié la présence de plusieurs marqueurs ostéoclastiques dans notre système de culture cellulaire tels que l'expression de la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP), la réponse à la calcitonine et la capacité de former des structures d'actine et de résorber l'os.

La phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) est une enzyme qui est fortement exprimée chez les ostéoclastes; on la retrouve dans les lysosomes, l'appareil de Golgi et les canaux de la membranes en brosse (Minkin, 1982). Même si la TRAP est exprimée dans une variété de tissus tels que les poumons, les intestins et les reins, elle est beaucoup plus abondante au niveau de l'os. La présence de la TRAP n'est pas spécifique aux ostéoclastes puisqu'elle est aussi exprimée chez les polykarions et les cellules géantes multinucléées (Hattersley *et al.*, 1989). Le rôle précis de la TRAP est encore incertain. Nous savons qu'elle est

importante pour la résorption et le développement même si des travaux faits avec des souris TRAP-déficiences montrent qu'elle n'est pas essentielle pour la résorption osseuse (Roodman, 1996).

Les récepteurs à la calcitonine sont présents en grande quantité chez les ostéoclastes humains (Nicholson *et al*, 1987) et sont une des caractéristiques importantes pour l'identification des ostéoclastes. Il a été démontré que les récepteurs à la calcitonine sont exprimés tardivement dans la différenciation des ostéoclastes (Takahashi *et al*, 1995), et se retrouvent donc seulement chez les ostéoclastes matures. Pour montrer la présence des récepteurs à la calcitonine chez les cellules multinucléées de notre préparation, nous avons traité les cellules avec de la calcitonine de saumon. La calcitonine est reconnue comme étant capable d'induire une augmentation de l'AMPc et du calcium intracellulaire chez plusieurs types de cellules dont les ostéoclastes (Moonga *et al*, 1992). La détermination du niveau d'AMPc intracellulaire dans une population hétérogène nécessite une procédure ardue de microinjection d'une sonde macromoléculaire (Civitelli *et al*, 1994). Nous avons donc choisi d'étudier l'augmentation du calcium intracellulaire provoqué par 1 μ M de calcitonine, dose à laquelle nous obtenons l'effet maximal sur le calcium intracellulaire, en utilisant la sonde calcique fluorescente Fluo-3.

Le réarrangement dynamique des structures d'actine est un processus fondamental pour plusieurs activités cellulaires des ostéoclastes, incluant l'adhésion, la migration, la polarisation. De plus, l'anneau d'actine est une structure spécifique

aux ostéoclastes en état de résorption (Redey *et al*, 1999). En plus de fournir un marqueur ostéoclastique supplémentaire, l'étude de la réorganisation des structures d'actine nous permet de déterminer dans quel stade se retrouvent les ostéoclastes. Nous avons classifié les structures d'actine en trois catégories distinctes : anneaux d'actine, lamellipodes et podosomes. Nous avons appelé anneau d'actine les structures d'actine qui formaient un anneau dans la cellule (Figure 8); cette structure représente les ostéoclastes qui sont dans un état de résorption. Généralement, un ostéoclaste qui possède cette structure est dans un état immobile. Certaines structures sont associées aux mouvements, comme les lamellipodes (Teti *et al*, 1991). Les lamellipodes sont formés suite à une réorganisation des podosomes à une extrémité de la cellule pour former un point d'ancrage qui permet à la cellule de se déplacer (Figure 9).

La méthode d'extraction des cellules utilisée nous a permis d'extraire des cellules multinucléées, TRAP positives et qui répondent à la calcitonine. De plus, ces cellules sont capables de former l'anneau d'actine et de résorber l'os.

La présence de ces marqueurs confirme que les cellules multinucléées retrouvées dans la préparation sont des ostéoclastes humains matures fonctionnels. Avec les différences pouvant exister dû au développement et à l'activité cellulaire, il est impossible d'extrapoler les résultats obtenus avec les ostéoclastes fœtaux aux ostéoclastes adultes. Cependant, il semble raisonnable de supposer que le modèle d'ostéoclastes fœtaux humains décrit dans cette étude est le modèle qui se

rapproche le plus des ostéoclastes humains matures. La nature hétérogène de notre préparation, qui contient 4.2 % de cellules multinucléées TRAP positives nous empêche d'utiliser des méthodes tels que les buvardages de type Northern et Western ainsi que le dosage de prostaglandines dans le milieu. Pour contourner ce problème, nous avons dû utiliser des techniques qui permettaient l'étude d'un type cellulaire particulier parmi une population hétérogène de cellules.

Nous avons montré avec l'hybridation *in situ* que les ostéoclastes humains expriment à la fois l'ARN messenger de la COX-1 et de la COX-2. Les résultats observés au niveau de l'ARN ont été confirmés par immunohistochimie. En utilisant des anticorps spécifiques pour chaque isoenzyme, nous avons montré que les deux protéines étaient présentes chez les ostéoclastes. L'isoforme COX-1 est localisée de façon majoritairement cytoplasmique tandis que l'isoforme COX-2 est majoritairement périnucléaire. La différence dans la distribution des isoformes de la cyclooxygénase a déjà été observée chez les cellules NIH-3T3 (Morita *et al*, 1995). Ces observations peuvent être interprétées comme étant des indications que les prostanoides formées via COX-2 pourraient avoir des effets directs sur le noyau (Smith *et al*, 1995). Une fois que nous avons démontré la présence des COX-1 et COX-2 tant au niveau de l'ARN messenger que de la protéine, nous avons étudié l'activité enzymatique des deux isoenzymes chez les ostéoclastes humains matures. Dû à l'hétérogénéité des types cellulaire présents dans notre préparation, il nous était impossible de doser le niveau de prostaglandines dans le milieu de culture. La détermination de l'activité enzymatique s'est faite en utilisant

une sonde fluorescente (H_2DCFDA) qui permet d'évaluer le processus d'oxydation qui se produit lors de la transformation de la PGG_2 en PGH_2 par les cyclooxygénases. La sonde H_2DCFDA nous permet donc, avec la microscopie confocale, de déterminer l'activité des cyclooxygénases chez une cellule isolée. Les résultats démontrés dans cette étude suggèrent que les ostéoclastes humains, dans les conditions expérimentales utilisées, possèdent un taux basal d'activité cyclooxygénase très élevé. De plus, nous avons montré que la COX-1 et la COX-2 étaient impliquées dans cette activité. L'absence d'augmentation de fluorescence suite à l'ajout de l'acide arachidonique peut indiquer la présence d'un haut niveau d'acide arachidonique endogène disponible et une forte activité de la phospholipase A_2 . Nous ne pouvons pas exclure la possibilité que cette observation soit provoquée par les conditions expérimentales. Cependant, le fait que les cellules NIH-3T3, dans des conditions où elles expriment la COX-1 et la COX-2 (Morita *et al*, 1995), ne montrent pas de haut niveau d'activité dans des conditions expérimentales identiques suggère que l'observation faite chez les ostéoclastes n'est pas due aux conditions expérimentales. Il est aussi possible que l'absence d'augmentation de la fluorescence suite à l'addition de l'acide arachidonique soit due à la saturation du système de détection. Cette possibilité n'invalide cependant pas le fait que les ostéoclastes possèdent un taux basal d'activité cyclooxygénase très élevé, observation qui a été confirmée en abolissant la fluorescence avec l'utilisation d'inhibiteurs des cyclooxygénases. Il est intéressant de noter que l'expression de la COX-2 peut être régulisée à la hausse par les protéines Rho, membres de la famille des petites guanosine triphosphatase

(GTPases) (Reiser *et al*, 1998; Slice *et al*, 1999; Subbaramaiah *et al*, 2000). Les Rho-GTPases agissent en tant que commutateurs moléculaires dans le contrôle de la voie de transduction du signal des récepteurs membranaires vers le cytosquelette (Hall, 1998). De plus, les Rho-GTPases jouent un rôle important dans l'attachement, l'étalement, l'organisation du cytosquelette, la formation de l'anneau d'actine et la résorption chez les ostéoclastes (Zhang *et al*, 1995; Lakkakorpi *et al*, 1997; Razzouk *et al*, 1999; Chellaiah *et al*, 2000; Ory *et al*, 2000). L'exoenzyme C3, un inhibiteur sélectif de la protéine Rho, a pour effet chez les ostéoclastes de souris de détruire l'anneau d'actine et de diminuer la résorption osseuse (Zhang *et al*, 1995). Vu que les ostéoclastes retrouvés dans notre préparation possèdent des anneaux d'actine, on peut assumer que les Rho-GTPases sont activées. Ainsi, il est possible de spéculer que l'expression élevée de la COX-2 observée dans notre préparation est due à l'activation des Rho-GTPases. Cette possibilité reste cependant à confirmer.

Malgré qu'il a déjà été démontré que la PGE₂ soit capable d'inhiber directement la résorption osseuse chez les ostéoclastes matures de lapin (Mano *et al*, 2000), l'impact de l'activité cyclooxygénase sur l'activité des ostéoclastes est difficile à évaluer à partir de cette étude sans connaître les prostaglandines produites par les ostéoclastes humains matures. Nos résultats suggèrent fortement que les ostéoclastes humains produisent la PGH₂, le produit final formé par les cyclooxygénases, mais d'autres études sont requises pour déterminer quelles sont les prostaglandines synthétisées exprimées par les ostéoclastes. Il est intéressant aussi de noter que la PGH₂ peut être métabolisée en des composés capables de se lier

aux peroxisome proliferator-activated receptors δ/β (PPAR δ/β) (Dussault *et al*, 2000). Les PPAR δ/β sont impliqués dans beaucoup de fonctions cellulaires en stimulant la transcription des gènes (Hertz *et al*, 1996; Michalik *et al*, 1999; Escher *et al*, 2000) et ils ont été retrouvés chez les ostéoclastes matures de lapins (Mano *et al*, 2000). La carbaprostacycline, un agoniste de la PGI₂ reconnu aussi comme étant un ligand des PPAR δ/β , a induit une augmentation de la résorption osseuse ainsi que l'expression de l'ARN messager de la cathepsin K, l'anhydrase carbonique II et de la phosphatase acide résistant au tartrate (TRAP) chez les ostéoclastes matures de lapins (Mano *et al*, 2000). L'activité des cyclooxygénases chez les ostéoclastes peut donc influencer l'activité de ces cellules de plusieurs façons. Nous pourrions observer une diminution de l'activité des ostéoclastes si la PGE₂ était la principale prostaglandine produite ou une augmentation de la différenciation et de l'activité si des prostaglandines capables de lier les PPARs étaient produites. Il est cependant important de souligner que la distribution des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes humains matures était, jusqu'à maintenant, inconnu. Il est donc possible que des prostanoïdes autres que la PGE₂ puissent influencer le métabolisme des ostéoclastes par des voies encore inconnues.

Pour mieux comprendre les effets des prostaglandines sur le métabolisme des ostéoclastes humains matures, nous avons étudié la distribution des récepteurs de type EP chez ces cellules. Nous avons montré que, dans les conditions expérimentales utilisées, les ostéoclastes humains matures exprimaient les ARNs

messagers et les protéines des sous-types EP₃ et EP₄. L'utilisation des anticorps dirigés contre chacun des sous-types du récepteur EP synthétisé et caractérisé dans notre laboratoire (Fortier, 2000), nous a permis d'observer la localisation des récepteurs par immunohistochimie. Le signal du récepteur EP₃ est réparti de façon uniforme dans la cellule suggérant une expression membranaire tandis que le signal du récepteur EP₄ est majoritairement nucléaire. Une étude faite chez les ostéoclastes matures de lapin a démontré que ces cellules exprimaient l'ARN messager du récepteur EP₄, mais aucune information sur la localisation n'a pu être fournie (Mano *et al*, 2000).

Plusieurs observations montrent que les récepteurs aux prostaglandines peuvent être nucléaires. Il existe d'autres récepteurs couplés aux protéines G, comme le récepteur à l'angiotensine I, qui ont déjà été localisés au niveau de la membrane nucléaire (Lu *et al*, 1998). De plus, la présence des cyclooxygénase-1 et 2 au niveau de la membrane nucléaire ayant été démontrée (Spencer *et al*, 1998), les prostaglandines, possédant un temps de demi-vie court, pourraient être synthétisées par la cellule au niveau du noyau et agir de façon autocrine, à proximité de leur lieu de synthèse, sans avoir à être transportées à l'extérieur de la cellule. L'existence de transporteurs aux prostaglandines permettant l'entrée des prostaglandines dans la cellule est une autre information qui renforce l'hypothèse de l'existence de récepteurs aux prostaglandines localisés au noyau (Kanai *et al*, 1995). Une étude récente a démontré la localisation nucléaire des récepteurs EP₃ et EP₄ dans le cerveau de porcs nouveau-nés et dans le foie de rats adultes

(Bhattacharya *et al*, 1999) et le même groupe a aussi démontré la localisation nucléaire du récepteur EP₁ dans le cerveau et l'utérus (Bhattacharya *et al*, 1998). Les auteurs ont aussi démontré que les récepteurs nucléaires sont fonctionnels, car ils affectent la transcription de gènes comme les gènes de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) et modulent les niveaux de calcium intracellulaires.

Il est intéressant de noter que le patron d'expression des récepteurs aux prostaglandines caractérisée dans la présente étude concorde parfaitement avec le patron d'expression retrouvé chez les ostéoclastes *in vivo*. Il a été démontré par une étude histologique utilisant des os fœtaux et adultes que les ostéoclastes retrouvés *in vivo* expriment les récepteurs EP₃ et EP₄ (Fortier, 2000). En plus de montrer qu'il n'existe pas de différence d'expression pour les récepteurs aux prostaglandines entre les ostéoclastes retrouvés *in vivo* et ceux *in vitro*, cette étude montre que les ostéoclastes fœtaux et adultes expriment les mêmes récepteurs. Ceci valide notre modèle d'ostéoclastes fœtaux matures humains en culture pour l'étude des effets des prostaglandines sur les ostéoclastes, car les prostaglandines devraient avoir des effets similaires sur les ostéoclastes fœtaux en culture et sur les ostéoclastes adultes retrouvés *in vivo*.

Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré la présence des récepteurs EP₃ et EP₄ chez les ostéoclastes matures humains en culture. Nous nous sommes donc intéressés aux effets de ces récepteurs sur les fonctions des ostéoclastes. Jusqu'à présent, nous savons que les prostaglandines possèdent

d'importants effets sur le métabolisme de l'os mais leur effet direct sur les ostéoclastes est encore très mal connu. La détermination des effets des prostaglandines sur les ostéoclastes pourrait mener au développement de nouvelles approches thérapeutiques contre les maladies osseuses. Après avoir réussi à démontrer que les ostéoclastes de notre préparation étaient capables de résorber l'os avec un essai de résorption *in vitro*, nous avons dû réévaluer le choix de la méthode utilisée pour étudier les effets des prostaglandines sur les fonctions des ostéoclastes. La méthode de résorption *in vitro* utilisée était, dans notre laboratoire, très peu reproductible. De plus, étant très limité dans la quantité de cellules isolées, il aurait été très difficile de mener à bien une étude complète en utilisant une telle méthode, qui exige un grand nombre de cellules. Nous avons donc entrepris l'étude sur les effets des récepteurs aux prostaglandines sur l'organisation des structures d'actine. En plus de posséder l'avantage d'être très simple à réaliser, avec un nombre relativement peu élevé de cellules, cette méthode nous permet d'observer plusieurs paramètres chez les ostéoclastes. Elle nous permet d'évaluer de façon indirecte l'activité de résorption, car il a été démontré que la présence d'un anneau d'actine indique que l'ostéoclaste est dans un stade activé de résorption (Silver *et al*, 1988). De plus, la coloration des filaments d'actine nous permet aussi de visualiser les lamellipodes, structures associées aux mouvements des ostéoclastes (Lakkakorpi *et al*, 1991) et les podosomes qui, distribués plus ou moins uniformément dans les cellules, démontrent un stade de transition. Cette méthode nous permet donc d'évaluer à la fois la résorption et la mobilité des ostéoclastes.

La PGE₂ a eu pour effet de diminuer de façon significative le pourcentage de cellules avec un anneau d'actine tandis que les autres paramètres semblent rester inchangés. Nous avons aussi départagé, avec l'utilisation de la 11-déoxy-PGE₁ et du misoprostol, les effets provoqués par les récepteurs EP₃ et EP₄ exprimés chez les ostéoclastes humains matures. La 11-déoxy-PGE₁, un agoniste sélectif EP₂/EP₄, a provoqué une forte diminution du pourcentage d'ostéoclastes avec un anneau d'actine et a augmenté le pourcentage d'ostéoclastes avec des podosomes. Ce résultat combiné avec celui qui montre que le butaprost, un agoniste EP₂, n'a pas d'effets significatifs sur aucun des paramètres observés, nous indique que le récepteur EP₄ est impliqué dans la diminution de la formation de l'anneau d'actine. Ainsi, sachant que la formation de l'anneau d'actine est essentielle à la résorption, le récepteur EP₄ semble jouer un rôle important dans la régulation de la résorption. L'implication du récepteur EP₄ dans l'inhibition de l'activité des ostéoclastes a été suggérée lors de l'étude de l'effet de la PGE₂ chez des ostéoclastes matures de lapins (Mano *et al*, 2000). Nos résultats ont aussi montré que le misoprostol, un agoniste sélectif EP₂/EP₃, diminuait le pourcentage d'ostéoclastes avec des lamellipodes et n'avait aucun effet sur la formation de l'anneau d'actine. Une fois de plus, ce résultat combiné à celui qui montre l'inactivité du butaprost, nous suggère que le récepteur EP₃ est impliqué au niveau de l'organisation des lamellipodes et par le fait même dans la mobilité des ostéoclastes. La capacité de la PGE₂ à inhiber la motilité a été mise en évidence chez les ostéoclastes de rat, de lapins et de poulet (Chambers *et al*, 1983; Arnett *et*

al, 1987). Cependant, lors des études antérieures, le récepteur responsable de cet effet n'avait pas été déterminé.

L'influence des prostaglandines sur les structures d'actine a été démontrée chez plusieurs types cellulaires (Hughes-Fulford *et al*, 1992; Banan *et al*, 2000). L'implication des récepteurs aux prostaglandines sur les structures d'actine a aussi été démontrée chez les cellules MDCK (*Mardin-Darby canine kidney*), le récepteur EP₃ jouant un rôle important dans la morphologie des cellules (Buhl *et al*, 1995; Hasegawa *et al*, 1997). L'étude de Hasegawa *et al*. (1997) a suggéré que l'effet du récepteur EP₃ dépend des protéines G_{α12} ou G_{α13}, capables d'activer les protéines de la famille des Rho-GTPases. Donc, même si des études plus poussées sont nécessaires pour déterminer la voie de signalisation des récepteurs EP₃ et EP₄ exprimés chez les ostéoclastes matures, il est probable que leurs effets sur les structures d'actine soient médiés par les protéines G_{α12} ou G_{α13}. Il peut paraître contradictoire que les récepteurs EP₃ et EP₄, capables d'inhiber la formation de lamellipodes et de l'anneau d'actine, exécutent leur action en activant les Rho-GTPases, car il a été décrit que les Rho-GTPases sont importantes pour la formation de l'anneau d'actine et des lamellipodes. Il a été montré que les protéines de la famille des Rho-GTPases peuvent avoir certains effets dans la cellule sans toutefois affecter le cytosquelette (Kato *et al*, 1997). Il est important de noter que la famille des Rho-GTPases est composée de plusieurs protéines n'ayant pas nécessairement le même effet biologique et que les voies de signalisation des Rho-GTPases sont très complexes. Alors une étude plus

approfondie demeure nécessaire pour déterminer l'effet des récepteurs sur l'activation des Rho-GTPases.

Nous avons montré que le récepteur EP₃ semblait avoir un effet inhibiteur sur la motilité des ostéoclastes et que le récepteur EP₄ inhibait la formation de l'anneau d'actine, affectant ainsi la capacité de résorption. Bien que nous ne puissions pas exclure totalement la participation des autres types cellulaires de la préparation aux phénomènes observés, la rapidité des changements observés (moins de 5 minutes) porte à croire que les effets observés sont bien dus aux récepteurs présents chez les ostéoclastes. De plus, la densité des cellules ne permettant pas un contact physique entre les cellules, on peut exclure l'influence des ostéoblastes qui ont absolument besoin d'un contact physique avec les ostéoclastes pour contrôler leur activité (Takahashi *et al*, 1999). Notre système a donc l'avantage d'éliminer la participation des ostéoblastes. Il a été démontré que lorsque les ostéoclastes et les ostéoblastes étaient en contact, les prostaglandines agissaient principalement via les ostéoblastes et augmentaient la différenciation des ostéoclastes ainsi que la résorption osseuse (Kaji *et al*, 1996; Suzawa *et al*, 2000). Cependant, les effets directs des prostaglandines sur les ostéoclastes sont impossibles à déterminer dans de tels systèmes. En montrant l'effet direct des prostaglandines sur les ostéoclastes matures humains, cette étude a démontré que les prostaglandines avaient un effet inhibiteur sur la fonction des ostéoclastes, soit la résorption osseuse.

Ces observations pourraient avoir d'importantes répercussions dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques dans le cadre des maladies osseuses. En effet, on retrouve une activité élevée des ostéoclastes dans plusieurs pathologies du système osseux. Il serait donc intéressant d'être capable de régulariser à la baisse la capacité de résorption des ostéoclastes. Cette étude nous a permis de montrer que le récepteur EP₃ était capable de diminuer la motilité des ostéoclastes et possiblement de réduire leur capacité de résorption. De plus, le récepteur EP₃ n'est pas exprimé chez les ostéoblastes (Sarrazin *et al*, 2001). Cette différence d'expression entre les ostéoblastes et les ostéoclastes pourrait être exploitée à l'aide d'outils pharmacologiques pour modifier le métabolisme de l'os. En activant le récepteur EP₃ avec un agoniste sélectif, on serait ainsi en mesure d'inhiber les ostéoclastes en n'affectant pas les ostéoblastes. Advenant le cas où l'activité des ostéoclastes serait diminuée sans que le soit celle des ostéoblastes, on rétablirait le métabolisme osseux et on pourrait même espérer une augmentation de la masse osseuse.

Pour tenter de concilier les effets apparemment paradoxaux des prostaglandines avec le métabolisme osseux, une hypothèse qui impliquerait les prostaglandines dans l'inter-régulation de l'activité cellulaire en fonction de la proximité des cellules a été imaginée. Les ostéoclastes et les ostéoblastes sont des types cellulaires étroitement liés et qui se retrouvent à proximité l'une de l'autre dans le processus du remodelage osseux. D'un point physiologique, il n'est pas souhaitable que les ostéoclastes résorbent la matrice sans la présence des

ostéoblastes, ceci aurait pour effet de laisser des lacunes de résorption non comblées et d'affaiblir la structure de l'os. Donc, il est possible que la PGE_2 joue un rôle important dans le processus qui régularise l'activité cellulaire en fonction de la proximité des ostéoclastes et des ostéoblastes. La PGE_2 est capable d'induire l'expression du *RANKL* chez les ostéoblastes (Kanematsu *et al*, 2000) et nous avons démontré que les ostéoblastes humains expriment le sous-type de récepteur EP_4 (Sarrazin *et al*, 2001). De plus, la présente étude démontre que les ostéoclastes humains expriment les récepteurs EP_3 et EP_4 qui inhibent respectivement la motilité et la résorption. Donc lorsque les cellules sont dispersées et qu'il n'y a aucun contact physique entre elles, la PGE_2 aurait pour effet de stimuler la production de *RANKL* chez les ostéoblastes et de placer les ostéoclastes dans un état d'inactivité. Sans un contact physique avec les ostéoblastes, la PGE_2 inhiberait la résorption et la motilité des ostéoclastes, ce qui leur permettrait d'être dans un état inactif jusqu'au contact des ostéoblastes. Lorsque que le contact physique entre les ostéoblastes et les ostéoclastes s'établirait, la liaison du *RANKL* et du *RANK* aurait pour effet de stimuler l'activité des ostéoclastes qui retrouveraient alors leur capacité de résorption et leur motilité. Au cours du processus de résorption, les ostéoclastes, qui se déplacent, s'éloigneraient des ostéoblastes. De ce fait, la liaison entre le *RANKL* et le *RANK* n'est plus possible et le cycle recommence. La PGE_2 empêcherait alors que les ostéoclastes ne résorbent et qu'ils se déplacent jusqu'à ce qu'il y ait contact avec les ostéoblastes. Cette théorie impliquerait bien sûr le fait que l'effet inhibiteur de la PGE_2 sur les ostéoclastes soit contre-balancé par un effet stimulateur plus puissant de la part du *RANKL*. On

sait que le *RANKL* en se liant au *RANK* permet l'activation du NF- κ B qui est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes (Verma *et al*, 1995; Baeuerle *et al*, 1996). Il est donc possible, qu'en plus de stimuler l'expression de gènes importants pour la résorption, l'activation du *RANK* amène un changement dans l'expression de gènes importants pour la réponse aux prostaglandines tels que les récepteurs ou les protéines de la voie de signalisation. Bien sûr, cette hypothèse reste à être vérifiée en plusieurs points, mais elle expliquerait les effets des prostaglandines sur les cellules osseuses, du moins en partie.

En conclusion, cette étude a démontré que les ostéoclastes humains matures en culture expriment à fois la COX-1 et la COX-2 et les récepteurs aux prostaglandines EP₃ et EP₄. Il a été aussi démontré que le récepteur EP₃ était impliqué dans la diminution de la motilité, en agissant sur les lamellipodes, et le récepteur EP₄ dans l'inhibition de la résorption, en inhibant la formation de l'anneau d'actine. La caractérisation de l'expression des isoformes de la COX et des récepteurs aux prostaglandines chez les ostéoclastes matures nous permet de mieux comprendre les effets des prostaglandines sur le métabolisme osseux. De plus, les résultats de cette étude nous permettent de croire que les prostaglandines ont un rôle important à jouer pour favoriser le contact cellule-cellule entre les ostéoclastes et les ostéoblastes. Les résultats de cette étude nous permettent de mieux comprendre les effets des prostaglandines sur les ostéoclastes matures et

pourraient, éventuellement, être très utiles dans le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour diminuer l'activité des ostéoclastes.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le Dr Artur de Brum-Fernandes, mon directeur de thèse, pour ses précieux conseils, sa compréhension et pour son amitié. Il a été, grâce à son expertise médicale et scientifique, un excellent superviseur et a su me transmettre les qualités nécessaires pour réussir. Grâce à son approche personnelle et respectueuse, il a su créer une ambiance de travail harmonieuse et très agréable. Je garderai d'excellents souvenirs de mon passage dans son laboratoire.

Je remercie aussi ceux qui m'ont apporté beaucoup d'aide technique, Léonid Volkov pour la microscopie confocale et Pierre Magny pour la microscopie électronique. Merci à tous les gens de l'Unité des Maladies Rhumatismales, ce fût vraiment une partie de plaisir de travailler à vos côtés. Un merci particulier à Maximilien Lora et Caroline Patry qui m'ont aidé à mes débuts et qui ont toujours été là. Merci à Marthe Filion, une personne extraordinaire, pour tout les services qu'elle a pu me rendre sans y être obligée. Merci au Dr Sylvain Chemtob, Dr Pierre Sirois et Dr Claude Asselin d'avoir bien voulu accepter d'évaluer ma thèse.

Finalement, un merci très particulier à tous ceux qui m'ont supporté tant moralement que financièrement pendant mes études graduées. Merci particulièrement à ma femme Mélanie et mes parents, Réjeanne et Jean-Pierre, ma sœur Martine et son mari Richard et à mes deux petits amours, Catherine et Hugo.

RÉFÉRENCES

1. BURGER, E. H., KLEIN-NULEND, J., VAN DER, P. A., et NIJWEIDE, P. J. (1995) Function of osteocytes in bone--their role in mechanotransduction. *J. Nutr.* **125**:2020S-2023S.
2. UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., AKATSU, T., TANAKA, H., SASAKI, T., NISHIHARA, T., KOGA, T., MARTIN, T. J., et SUDA, T. (1990) Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**:7260-7264.
3. SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LUTHY, R., NGUYEN, H. Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T. *et al.* (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density [see comments]. *Cell* **89**:309-319.
4. LACEY, D. L., TIMMS, E., TAN, H. L., KELLEY, M. J., DUNSTAN, C. R., BURGESS, T., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., ELLIOTT, G., SCULLY, S. *et al.* (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93**:165-176.
5. KANEHISA, J. et HEERSCHE, J. N. (1988) Osteoclastic bone resorption: in vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts. *Bone* **9**:73-79.
6. OLDBERG, A., FRANZEN, A., et HEINEGARD, D. (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an

- Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**:8819-8823.
7. NESBITT, S., NESBIT, A., HELFRICH, M., et HORTON, M. (1993) Biochemical characterization of human osteoclast integrins. Osteoclasts express alpha v beta 3, alpha 2 beta 1, and alpha v beta 1 integrins. *J. Biol. Chem.* **268**:16737-16745.
 8. HUGHES, D. E., SALTER, D. M., DEDHAR, S., et SIMPSON, R. (1993) Integrin expression in human bone. *J. Bone Miner. Res.* **8**:527-533.
 9. CHELLAIAH, M., KIZER, N., SILVA, M., ALVAREZ, U., KWIATKOWSKI, D., et HRUSKA, K. A. (2000) Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. *J. Cell Biol.* **148**:665-678.
 10. TETI, A., MARCHISIO, P. C., et ZALLONE, A. Z. (1991) Clear zone in osteoclast function: role of podosomes in regulation of bone-resorbing activity. *Am. J. Physiol* **261**:C1-C7.
 11. SILVER, I. A., MURRILLS, R. J., et ETHERINGTON, D. J. (1988) Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp. Cell Res.* **175**:266-276.
 12. VAANANEN, H. K. et HORTON, M. (1995) The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 8)**:2729-2732.
 13. BLAIR, H. C., KAHN, A. J., CROUCH, E. C., JEFFREY, J. J., et TEITELBAUM, S. L. (1986) Isolated osteoclasts resorb the organic and inorganic components of bone. *J. Cell Biol.* **102**:1164-1172.
 14. BLAIR, H. C., TEITELBAUM, S. L., GHISELLI, R., et GLUCK, S. (1989) Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science* **245**:855-857.

15. MATTSSON, J. P., SCHLESINGER, P. H., KEELING, D. J., TEITELBAUM, S. L., STONE, D. K., et XIE, X. S. (1994) Isolation and reconstitution of a vacuolar-type proton pump of osteoclast membranes. *J. Biol. Chem.* **269**:24979-24982.
16. SCHLESINGER, P. H., BLAIR, H. C., TEITELBAUM, S. L., et EDWARDS, J. C. (1997) Characterization of the osteoclast ruffled border chloride channel and its role in bone resorption. *J. Biol. Chem.* **272**:18636-18643.
17. WERB, Z. (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**:439-442.
18. SATO, T., DEL CARMEN, O. M., HOU, P., HEEGAARD, A. M., KUMEGAWA, M., FOGED, N. T., et DELAISSE, J. M. (1997) Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts. *J. Cell Sci.* **110 (Pt 5)**:589-596.
19. BLAVIER, L. et DELAISSE, J. M. (1995) Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 12)**:3649-3659.
20. INAOKA, T., BILBE, G., ISHIBASHI, O., TEZUKA, K., KUMEGAWA, M., et KOKUBO, T. (1995) Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cysteine proteinase predominantly expressed in bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **206**:89-96.
21. BOSSARD, M. J., TOMASZEK, T. A., THOMPSON, S. K., AMEGADZIE, B. Y., HANNING, C. R., JONES, C., KURDYLA, J. T., MCNULTY, D. E., DRAKE, F. H., GOWEN, M. *et al.* (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J. Biol. Chem.* **271**:12517-12524.

22. NESBITT, S. A. et HORTON, M. A. (1997) Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts [see comments]. *Science* **276**:266-269.
23. SALO, J., LEHENKARI, P., MULARI, M., METSIKKO, K., et VAANANEN, H. K. (1997) Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis [see comments]. *Science* **276**:270-273.
24. LI, X., OKADA, Y., PILBEAM, C. C., LORENZO, J. A., KENNEDY, C. R., BREYER, R. M., et RAISZ, L. G. (2000) Knockout of the murine prostaglandin EP2 receptor impairs osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* **141**:2054-2061.
25. SATO, T., MORITA, I., et MUROTA, S. (1997) Prostaglandin E2 mediates parathyroid hormone induced osteoclast formation by cyclic AMP independent mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **407**:383-386.
26. TSUKII, K., SHIMA, N., MOCHIZUKI, S., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., YANO, K., SHIBATA, O., UDAGAWA, N., YASUDA, H., SUDA, T. *et al.* (1998) Osteoclast differentiation factor mediates an essential signal for bone resorption induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, prostaglandin E2, or parathyroid hormone in the microenvironment of bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**:337-341.
27. TAKEDA, S., YOSHIZAWA, T., NAGAI, Y., YAMATO, H., FUKUMOTO, S., SEKINE, K., KATO, S., MATSUMOTO, T., et FUJITA, T. (1999) Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using VDR knockout mice. *Endocrinology* **140**:1005-1008.
28. MAZZUOLI, G. F., PASSERI, M., GENNARI, C., MINISOLA, S., ANTONELLI, R., VALTORTA, C., PALUMMERI, E., CERVELLIN, G.

- F., GONNELLI, S., et FRANCINI, G. (1986) Effects of salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis: a controlled double-blind clinical study. *Calcif. Tissue Int.* **38**:3-8.
29. RIFAS, L. (1999) Bone and cytokines: beyond IL-1, IL-6 and TNF-alpha. *Calcif. Tissue Int.* **64**:1-7.
 30. FUJIKAWA, Y., SABOKBAR, A., NEALE, S. D., ITONAGA, I., TORISU, T., et ATHANASOU, N. A. (2001) The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor-alpha, and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone* **28**:261-267.
 31. KAMOLMATYAKUL, S., CHEN, W., et LI, Y. P. (2001) Interferon-gamma down-regulates gene expression of cathepsin K in osteoclasts and inhibits osteoclast formation. *J. Dent. Res.* **80**:351-355.
 32. MUNDY, G. R. (1993) Role of cytokines in bone resorption. *J. Cell Biochem.* **53**:296-300.
 33. AUBIN, J. E. et BONNELYE, E. (2000) Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos. Int.* **11**:905-913.
 34. CHAPUY, M. C., CHAPUY, P., et MEUNIER, P. J. (1987) Calcium and vitamin D supplements: effects on calcium metabolism in elderly people. *Am. J. Clin. Nutr.* **46**:324-328.
 35. LINDSAY, R. et TOHME, J. F. (1990) Estrogen treatment of patients with established postmenopausal osteoporosis. *Obstet. Gynecol.* **76**:290-295.
 36. AGNUSDEI, D., LIU-LEAGE, S., et AUGENDRE-FERRANTE, B. (1999) [Results of international clinical trials with raloxifene]. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **60**:242-246.

37. FITTON, A. et MCTAVISH, D. (1991) Pamidronate. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in resorptive bone disease. *Drugs* **41**:289-318.
38. SAMBROOK, P., BIRMINGHAM, J., KELLY, P., KEMPLER, S., NGUYEN, T., POCKOCK, N., et EISMAN, J. (1993) Prevention of corticosteroid osteoporosis. A comparison of calcium, calcitriol, and calcitonin. *N. Engl. J. Med.* **328**:1747-1752.
39. RIGGS, B. L., HODGSON, S. F., O'FALLON, W. M., CHAO, E. Y., WAHNER, H. W., MUHS, J. M., CEDEL, S. L., et MELTON, L. J. (1990) Effect of fluoride treatment on the fracture rate in postmenopausal women with osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **322**:802-809.
40. RIGGS, B. L. et MELTON, L. J. (1992) The prevention and treatment of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **327**:620-627.
41. MARIE, P. J., AMMANN, P., BOIVIN, G., et REY, C. (2001) Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone. *Calcif. Tissue Int.* **69**:121-129.
42. NARUMIYA, S., SUGIMOTO, Y., et USHIKUBI, F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* **79**:1193-1226.
43. DEWITT, D. L. et SMITH, W. L. (1988) Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**:1412-1416.
44. MERLIE, J. P., FAGAN, D., MUDD, J., et NEEDLEMAN, P. (1988) Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.* **263**:3550-3553.

45. YOKOYAMA, C., TAKAI, T., et TANABE, T. (1988) Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.* **231**:347-351.
46. SMITH, W. L., GARAVITO, R. M., et DEWITT, D. L. (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **271**:33157-33160.
47. VANE, J. R., BAKHLE, Y. S., et BOTTING, R. M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**:97-120.
48. OTTO, J. C. et SMITH, W. L. (1995) Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* **12**:139-156.
49. HERSCHMAN, H. R. (1996) Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta* **1299**:125-140.
50. O'NEILL, G. P., MANCINI, J. A., KARGMAN, S., YERGEY, J., KWAN, M. Y., FALGUEYRET, J. P., ABRAMOVITZ, M., KENNEDY, B. P., OUELLET, M., CROMLISH, W. *et al.* (1994) Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus: inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol. Pharmacol.* **45**:245-254.
51. MITCHELL, J. A., AKARASEREENONT, P., THIEMERMANN, C., FLOWER, R. J., et VANE, J. R. (1993) Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:11693-11697.
52. LANZA, F. L. (1989) A review of gastric ulcer and gastroduodenal injury in normal volunteers receiving aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl* **163**:24-31.
53. RIENDEAU, D., PERCIVAL, M. D., BOYCE, S., BRIDEAU, C., CHARLESON, S., CROMLISH, W., ETHIER, D., EVANS, J.,

- FALGUEYRET, J. P., FORD-HUTCHINSON, A. W. *et al.* (1997) Biochemical and pharmacological profile of a tetrasubstituted furanone as a highly selective COX-2 inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* **121**:105-117.
54. FUTAKI, N., TAKAHASHI, S., YOKOYAMA, M., ARAI, I., HIGUCHI, S., *et* OTOMO, S. (1994) NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. *Prostaglandins* **47**:55-59.
 55. PATRONO, C., PATRIGNANI, P., *et* GARCIA RODRIGUEZ, L. A. (2001) Cyclooxygenase-selective inhibition of prostanoid formation: transducing biochemical selectivity into clinical read-outs. *J. Clin. Invest* **108**:7-13.
 56. COLEMAN, R. A., SMITH, W. L., *et* NARUMIYA, S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol. Rev.* **46**:205-229.
 57. NAMBA, T., SUGIMOTO, Y., NEGISHI, M., IRIE, A., USHIKUBI, F., KAKIZUKA, A., ITO, S., ICHIKAWA, A., *et* NARUMIYA, S. (1993) Alternative splicing of C-terminal tail of prostaglandin E receptor subtype EP3 determines G-protein specificity. *Nature* **365**:166-170.
 58. COLEMAN, R. A., HUMPHREY, P. P., KENNEDY, I., LEVY, G. P., *et* LUMLEY, P. (1981) Comparison of the actions of U-46619, a prostaglandin H₂-analogue, with those of prostaglandin H₂ and thromboxane A₂ on some isolated smooth muscle preparations. *Br. J. Pharmacol.* **73**:773-778.
 59. TOWN, M. H., CASALS-STENZEL, J., *et* SCHILLINGER, E. (1983) Pharmacological and cardiovascular properties of a hydantoin derivative, BW 245 C, with high affinity and selectivity for PGD₂ receptors. *Prostaglandins* **25**:13-28.

60. GILES, H., LEFF, P., BOLOFO, M. L., KELLY, M. G., et ROBERTSON, A. D. (1989) The classification of prostaglandin DP-receptors in platelets and vasculature using BW A868C, a novel, selective and potent competitive antagonist. *Br. J. Pharmacol.* **96**:291-300.
61. LYDFORD, S. J., MCKECHNIE, K. C., et DOUGALL, I. G. (1996) Pharmacological studies on prostanoid receptors in the rabbit isolated saphenous vein: a comparison with the rabbit isolated ear artery. *Br. J. Pharmacol.* **117**:13-20.
62. HALUSHKA, P. V., MAIS, D. E., MAYEUX, P. R., et MORINELLI, T. A. (1989) Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**:213-239.
63. BOIE, Y., SAWYER, N., SLIPETZ, D. M., METTERS, K. M., et ABRAMOVITZ, M. (1995) Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *J. Biol. Chem.* **270**:18910-18916.
64. IMAMURA, Y., KOZAWA, O., SUZUKI, A., WATANABE, Y., SAITO, H., et OISO, Y. (1995) Mechanism of phospholipase D activation induced by prostaglandin D2 in osteoblast-like cells: function of Ca²⁺/calmodulin. *Cell Signal.* **7**:45-51.
65. SARRAZIN, P., BKAILY, G., HACHE, R., PATRY, C., DUMAIS, R., ROCHA, F. A., et BRUM-FERNANDES, A. J. (2001) Characterization of the prostaglandin receptors in human osteoblasts in culture. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **64**:203-210.
66. BUNCE, K. T., CLAYTON, N. M., COLEMAN, R. A., COLLINGTON, E. W., FINCH, H., HUMPHRAY, J. M., HUMPHREY, P. P., REEVES, J. J., SHELDRIK, R. L., et STABLES, R. (1991) GR63799X--a novel prostanoid with selectivity for EP3 receptors. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* **21A**:379-382.

67. LAWRENCE, R. A. et JONES, R. L. (1992) Investigation of the prostaglandin E (EP-) receptor subtype mediating relaxation of the rabbit jugular vein. *Br. J. Pharmacol.* **105**:817-824.
68. SENIOR, J., MARSHALL, K., SANGHA, R., BAXTER, G. S., et CLAYTON, J. K. (1991) In vitro characterization of prostanoid EP-receptors in the non- pregnant human myometrium. *Br. J. Pharmacol.* **102**:747-753.
69. GARDINER, P. J. (1986) Characterization of prostanoid relaxant/inhibitory receptors (psi) using a highly selective agonist, TR4979. *Br. J. Pharmacol.* **87**:45-56.
70. REGAN, J. W., BAILEY, T. J., PEPPERL, D. J., PIERCE, K. L., BOGARDUS, A. M., DONELLO, J. E., FAIRBAIRN, C. E., KEDZIE, K. M., WOODWARD, D. F., et GIL, D. W. (1994) Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype. *Mol. Pharmacol.* **46**:213-220.
71. COLLINS, P. W. (1986) Development and therapeutic role of synthetic prostaglandins in peptic ulcer disease. *J. Med. Chem.* **29**:437-443.
72. DONG, Y. J., JONES, R. L., et WILSON, N. H. (1986) Prostaglandin E receptor subtypes in smooth muscle: agonist activities of stable prostacyclin analogues. *Br. J. Pharmacol.* **87**:97-107.
73. BRUM-FERNANDES, A. J., MORISSET, S., BKAILY, G., et PATRY, C. (1996) Characterization of the PGE2 receptor subtype in bovine chondrocytes in culture. *Br. J. Pharmacol.* **118**:1597-1604.
74. COLEMAN, R. A., GRIX, S. P., HEAD, S. A., LOUTTIT, J. B., MALLETT, A., et SHELDRIK, R. L. (1994) A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* **47**:151-168.

75. ARMSTRONG, R. A., LAWRENCE, R. A., JONES, R. L., WILSON, N. H., et COLLIER, A. (1989) Functional and ligand binding studies suggest heterogeneity of platelet prostacyclin receptors. *Br. J. Pharmacol.* **97**:657-668.
76. MALMSTEN, C. (1976) Some biological effects of prostaglandin endoperoxide analogs. *Life Sci.* **18**:169-176.
77. KLEIN, D. C. et RAISZ, L. G. (1970) Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* **86**:1436-1440.
78. BRUM-FERNANDES, A. J., LAPORTE, S., HEROUX, M., LORA, M., PATRY, C., MENARD, H. A., DUMAIS, R., et LEDUC, R. (1994) Expression of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **198**:955-960.
79. RAISZ, L. G., VANDERHOEK, J. Y., SIMMONS, H. A., KREAM, B. E., et NICOLAOU, K. C. (1979) Prostaglandin synthesis by fetal rat bone in vitro: evidence for a role of prostacyclin. *Prostaglandins* **17**:905-914.
80. VOELKEL, E. F., TASHJIAN, A. H., JR., et LEVINE, L. (1980) Cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism by mouse bone in organ culture. *Biochim. Biophys. Acta* **620**:418-428.
81. RAISZ, L. G., ALANDER, C. B., et SIMMONS, H. A. (1989) Effects of prostaglandin E3 and eicosapentaenoic acid on rat bone in organ culture. *Prostaglandins* **37**:615-625.
82. RAISZ, L. G. et WOODIEL, F. N. (1989) Effect of alterations in the cyclopentane ring on bone resorptive activity of prostaglandin. *Prostaglandins* **37**:229-235.
83. TASHJIAN, A. H., JR., BOSMA, T. J., et LEVINE, L. (1988) Use of minoxidil to demonstrate that prostacyclin is not the mediator of bone

resorption stimulated by growth factors in mouse calvariae. *Endocrinology* **123**:969-974.

84. RAISZ, L. G., ALANDER, C. B., FALL, P. M., et SIMMONS, H. A. (1990) Effects of prostaglandin F2 alpha on bone formation and resorption in cultured neonatal mouse calvariae: role of prostaglandin E2 production. *Endocrinology* **126**:1076-1079.
85. MINKIN, C., FREDERICKS, R. S., POKRESS, S., RUDE, R. K., SHARP, C. F., JR., TONG, M., et SINGER, F. R. (1981) Bone resorption and humoral hypercalcemia of malignancy: stimulation of bone resorption in vitro by tumor extracts is inhibited by prostaglandin synthesis inhibitors. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **53**:941-947.
86. TASHJIAN, A. H., JR., VOELKEL, E. F., LAZZARO, M., GOAD, D., BOSMA, T., et LEVINE, L. (1987) Tumor necrosis factor-alpha (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. *Endocrinology* **120**:2029-2036.
87. HARRIS, M., JENKINS, M. V., BENNETT, A., et WILLS, M. R. (1973) Prostaglandin production and bone resorption by dental cysts. *Nature* **245**:213-215.
88. HARVEY, W., GUAT-CHEN, F., GORDON, D., MEGHJI, S., EVANS, A., et HARRIS, M. (1984) Evidence for fibroblasts as the major source of prostacyclin and prostaglandin synthesis in dental cyst in man. *Arch. Oral Biol.* **29**:223-229.
89. ROBINSON, D. R., TASHJIAN, A. H., JR., et LEVINE, L. (1975) Prostaglandin-stimulated bone resorption by rheumatoid synovia. A possible mechanism for bone destruction in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest* **56**:1181-1188.

90. GOLDRING, S. R., SCHILLER, A. L., ROELKE, M., ROURKE, C. M., O'NEIL, D. A., et HARRIS, W. H. (1983) The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J. Bone Joint Surg. [Am.]* **65**:575-584.
91. HOROWITZ, S. M., RAPUANO, B. P., LANE, J. M., et BURSTEIN, A. H. (1994) The interaction of the macrophage and the osteoblast in the pathophysiology of aseptic loosening of joint replacements. *Calcif. Tissue Int.* **54**:320-324.
92. SUZAWA, T., MIYAURA, C., INADA, M., MARUYAMA, T., SUGIMOTO, Y., USHIKUBI, F., ICHIKAWA, A., NARUMIYA, S., et SUDA, T. (2000) The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* **141**:1554-1559.
93. MANO, M., ARAKAWA, T., MANO, H., NAKAGAWA, M., KANEDA, T., KANEKO, H., YAMADA, T., MIYATA, K., KIYOMURA, H., KUMEGAWA, M. *et al.* (2000) Prostaglandin E2 directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts mainly through the EP4 receptor. *Calcif. Tissue Int.* **67**:85-92.
94. FULLER, K. et CHAMBERS, T. J. (1989) Effect of arachidonic acid metabolites on bone resorption by isolated rat osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* **4**:209-215.
95. BLUMENKRANTZ, N. et SONDERGAARD, J. (1972) Effect of prostaglandins E 1 and F 1 on biosynthesis of collagen. *Nat. New Biol.* **239**:246.
96. RAISZ, L. G. et KOOLEMANS-BEYNEN, A. R. (1974) Inhibition of bone collagen synthesis by prostaglandin E2 in organ culture. *Prostaglandins* **8**:377-385.

97. CHYUN, Y. S. et RAISZ, L. G. (1984) Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. *Prostaglandins* **27**:97-103.
98. FLANAGAN, A. M. et CHAMBERS, T. J. (1992) Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostaglandins E1 and E2. *Endocrinology* **130**:443-448.
99. KOSHIHARA, Y. et KAWAMURA, M. (1989) Prostaglandin D2 stimulates calcification of human osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**:1206-1212.
100. GRONOWICZ, G. A., FALL, P. M., et RAISZ, L. G. (1994) Prostaglandin E2 stimulates preosteoblast replication: an autoradiographic study in cultured fetal rat calvariae. *Exp. Cell Res.* **212**:314-320.
101. HAKEDA, Y., IKEDA, E., KURIHARA, N., NAKATANI, Y., MAEDA, N., et KUMEGAWA, M. (1985) Induction of osteoblastic cell differentiation by forskolin. Stimulation of cyclic AMP production and alkaline phosphatase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **838**:49-53.
102. HAKEDA, Y., YOSHINO, T., NATAKANI, Y., KURIHARA, N., MAEDA, N., et KUMEGAWA, M. (1986) Prostaglandin E2 stimulates DNA synthesis by a cyclic AMP-independent pathway in osteoblastic clone MC3T3-E1 cells. *J. Cell Physiol* **128**:155-161.
103. HAKEDA, Y., HOTTA, T., KURIHARA, N., IKEDA, E., MAEDA, N., YAGYU, Y., et KUMEGAWA, M. (1987) Prostaglandin E1 and F2 alpha stimulate differentiation and proliferation, respectively, of clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells by different second messengers in vitro. *Endocrinology* **121**:1966-1974.
104. LADER, C. S. et FLANAGAN, A. M. (1998) Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology* **139**:3157-3164.

105. STEPHAN, S., PURCELL, W. M., et CHANDER, C. L. (1999) Colony stimulating factors regulate nitric oxide and prostaglandin E₂ production in rat cartilage chondrocytes. *Int. J. Tissue React.* **21**:113-119.
106. BRANDSTROM, H., BJORKMAN, T., et LJUNGGREN, O. (2001) Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**:831-835.
107. ONOE, Y., MIYAURA, C., KAMINAKAYASHIKI, T., NAGAI, Y., NOGUCHI, K., CHEN, Q. R., SEO, H., OHTA, H., NOZAWA, S., KUDO, I. *et al.* (1996) IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2- dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J. Immunol.* **156**:758-764.
108. AUBIN, J. E. et BONNELYE, E. (2000) Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Medscape. Womens Health* **5**:5.
109. FUJIEDA, M., KIRIU, M., MIZUOCHI, S., HAGIYA, K., KANEKI, H., et IDE, H. (1999) Formation of mineralized bone nodules by rat calvarial osteoblasts decreases with donor age due to a reduction in signaling through EP(1) subtype of prostaglandin E(2) receptor. *J. Cell Biochem.* **75**:215-225.
110. SUDA, M., TANAKA, K., NATSUI, K., USUI, T., TANAKA, I., FUKUSHIMA, M., SHIGENO, C., KONISHI, J., NARUMIYA, S., ICHIKAWA, A. *et al.* (1996) Prostaglandin E receptor subtypes in mouse osteoblastic cell line. *Endocrinology* **137**:1698-1705.
111. SUDA, M., TANAKA, K., SAKUMA, Y., YASODA, A., OZASA, A., FUKATA, J., TANAKA, I., NARUMIYA, S., et NAKAO, K. (2000) Prostaglandin E(2) (PGE(2)) induces the c-fos and c-jun expressions via

- the EP(1) subtype of PGE receptor in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Calcif. Tissue Int.* **66**:217-223.
112. KANEKI, H., TAKASUGI, I., FUJIEDA, M., KIRIU, M., MIZUOCHI, S., et IDE, H. (1999) Prostaglandin E2 stimulates the formation of mineralized bone nodules by a cAMP-independent mechanism in the culture of adult rat calvarial osteoblasts. *J. Cell Biochem.* **73**:36-48.
 113. INOUE, H., TSUJISAWA, T., FUKUIZUMI, T., KAWAGISHI, S., et UCHIYAMA, C. (1999) SC-19220, a prostaglandin E2 antagonist, inhibits osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in cell cultures. *J. Endocrinol.* **161**:231-236.
 114. SAKUMA, Y., TANAKA, K., SUDA, M., YASODA, A., NATSUI, K., TANAKA, I., USHIKUBI, F., NARUMIYA, S., SEGI, E., SUGIMOTO, Y. *et al.* (2000) Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide. *J. Bone Miner. Res.* **15**:218-227.
 115. CHAMBERS, T. J. et MAGNUS, C. J. (1982) Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J. Pathol.* **136**:27-39.
 116. ZHANG, D., UDAGAWA, N., NAKAMURA, I., MURAKAMI, H., SAITO, S., YAMASAKI, K., SHIBASAKI, Y., MORII, N., NARUMIYA, S., et TAKAHASHI, N. (1995) The small GTP-binding protein, rho p21, is involved in bone resorption by regulating cytoskeletal organization in osteoclasts. *J. Cell Sci.* **108 (Pt 6)**:2285-2292.
 117. MORITA, I., SCHINDLER, M., REGIER, M. K., OTTO, J. C., HORI, T., DEWITT, D. L., et SMITH, W. L. (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **270**:10902-10908.

118. MORITA, I., SMITH, W. L., DEWITT, D. L., et SCHINDLER, M. (1995) Expression-activity profiles of cells transfected with prostaglandin endoperoxide H synthase measured by quantitative fluorescence microscopy. *Biochemistry* **34**:7194-7199.
119. LORA, M., DENAULT, J. B., LEDUC, R., et BRUM-FERNANDES, A. J. (1998) Systematic pharmacological approach to the characterization of NSAIDs. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **59**:55-62.
120. RIENDEAU, D., CHARLESON, S., CROMLISH, W., MANCINI, J. A., WONG, E., et GUAY, J. (1997) Comparison of the cyclooxygenase-1 inhibitory properties of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and selective COX-2 inhibitors, using sensitive microsomal and platelet assays. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **75**:1088-1095.
121. SARMA, U. et FLANAGAN, A. M. (1996) Macrophage colony-stimulating factor induces substantial osteoclast generation and bone resorption in human bone marrow cultures. *Blood* **88**:2531-2540.
122. MATSUZAKI, K., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., YAMAGUCHI, K., YASUDA, H., SHIMA, N., MORINAGA, T., TOYAMA, Y., YABE, Y., HIGASHIO, K. *et al.* (1998) Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**:199-204.
123. BREUIL, V., COSMAN, F., STEIN, L., HORBERT, W., NIEVES, J., SHEN, V., LINDSAY, R., et DEMPSTER, D. W. (1998) Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. *J. Bone Miner. Res.* **13**:1721-1729.
124. QUINN, J. M., NEALE, S., FUJIKAWA, Y., MCGEE, J. O., et ATHANASOU, N. A. (1998) Human osteoclast formation from blood

monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells. *Calcif. Tissue Int.* **62**:527-531.

125. ATKINS, G. J., HAYNES, D. R., GEARY, S. M., LORIC, M., CROTTI, T. N., et FINDLAY, D. M. (2000) Coordinated cytokine expression by stromal and hematopoietic cells during human osteoclast formation. *Bone* **26**:653-661.
126. YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., GOTO, M., MOCHIZUKI, S. I., TSUDA, E., MORINAGA, T., UDAGAWA, N. *et al.* (1999) A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone* **25**:109-113.
127. FOX, S. W., FULLER, K., et CHAMBERS, T. J. (2000) Activation of osteoclasts by interleukin-1: divergent responsiveness in osteoclasts formed in vivo and in vitro. *J. Cell Physiol* **184**:334-340.
128. MINKIN, C. (1982) Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif. Tissue Int.* **34**:285-290.
129. HATTERSLEY, G. et CHAMBERS, T. J. (1989) Generation of osteoclastic function in mouse bone marrow cultures: multinuclearity and tartrate-resistant acid phosphatase are unreliable markers for osteoclastic differentiation. *Endocrinology* **124**:1689-1696.
130. ROODMAN, G. D. (1996) Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr. Rev.* **17**:308-332.
131. NICHOLSON, G. C., HORTON, M. A., SEXTON, P. M., D'SANTOS, C. S., MOSELEY, J. M., KEMP, B. E., PRINGLE, J. A., et MARTIN, T. J. (1987) Calcitonin receptors of human osteoclastoma. *Horm. Metab Res.* **19**:585-589.

132. TAKAHASHI, S., GOLDRING, S., KATZ, M., HILSENBECK, S., WILLIAMS, R., et ROODMAN, G. D. (1995) Downregulation of calcitonin receptor mRNA expression by calcitonin during human osteoclast-like cell differentiation. *J. Clin. Invest* **95**:167-171.
133. MOONGA, B. S., ALAM, A. S., BEVIS, P. J., AVALDI, F., SONCINI, R., HUANG, C. L., et ZAIDI, M. (1992) Regulation of cytosolic free calcium in isolated rat osteoclasts by calcitonin. *J. Endocrinol.* **132**:241-249.
134. CIVITELLI, R., BACSKAI, B. J., MAHAUT-SMITH, M. P., ADAMS, S. R., AVIOLI, L. V., et TSIEN, R. Y. (1994) Single-cell analysis of cyclic AMP response to parathyroid hormone in osteoblastic cells. *J. Bone Miner. Res.* **9**:1407-1417.
135. REDEY, S. A., RAZZOUK, S., REY, C., BERNACHE-ASSOLLANT, D., LEROY, G., NARDIN, M., et COURNOT, G. (1999) Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *J. Biomed. Mater. Res.* **45**:140-147.
136. SMITH, W. L. et DEWITT, D. L. (1995) Biochemistry of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and synthase-2 and their differential susceptibility to nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin. Nephrol.* **15**:179-194.
137. SLICE, L. W., WALSH, J. H., et ROZENGURT, E. (1999) Galpha(13) stimulates Rho-dependent activation of the cyclooxygenase-2 promoter. *J. Biol. Chem.* **274**:27562-27566.
138. SUBBARAMAIAH, K., HART, J. C., NORTON, L., et DANNENBERG, A. J. (2000) Microtubule-interfering agents stimulate the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of ERK1/2 AND p38

- mitogen- activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **275**:14838-14845.
139. REISER, C. O., LANZ, T., HOFMANN, F., HOFER, G., RUPPRECHT, H. D., et GOPPELT-STRUEBE, M. (1998) Lysophosphatidic acid-mediated signal-transduction pathways involved in the induction of the early-response genes prostaglandin G/H synthase-2 and Egr-1: a critical role for the mitogen-activated protein kinase p38 and for Rho proteins. *Biochem. J.* **330 (Pt 3)**:1107-1114.
 140. HALL, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**:509-514.
 141. LAKKAKORPI, P. T., WESOLOWSKI, G., ZIMOLO, Z., RODAN, G. A., et RODAN, S. B. (1997) Phosphatidylinositol 3-kinase association with the osteoclast cytoskeleton, and its involvement in osteoclast attachment and spreading. *Exp. Cell Res.* **237**:296-306.
 142. RAZZOUK, S., LIEBERHERR, M., et COURNOT, G. (1999) Rac-GTPase, osteoclast cytoskeleton and bone resorption. *Eur. J. Cell Biol.* **78**:249-255.
 143. ORY, S., MUNARI-SILEM, Y., FORT, P., et JURDIC, P. (2000) Rho and Rac exert antagonistic functions on spreading of macrophage- derived multinucleated cells and are not required for actin fiber formation. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 7)**:1177-1188.
 144. CHELLAIAH, M. A., SOGA, N., SWANSON, S., MCALLISTER, S., ALVAREZ, U., WANG, D., DOWDY, S. F., et HRUSKA, K. A. (2000) Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J. Biol. Chem.* **275**:11993-12002.
 145. MANO, M., ARAKAWA, T., MANO, H., NAKAGAWA, M., KANEDA, T., KANEKO, H., YAMADA, T., MIYATA, K., KIYOMURA, H.,

- KUMEGAWA, M. *et al.* (2000) Prostaglandin E2 directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts mainly through the EP4 receptor [In Process Citation]. *Calcif. Tissue Int.* **67**:85-92.
146. DUSSAULT, I. et FORMAN, B. M. (2000) Prostaglandins and fatty acids regulate transcriptional signaling via the peroxisome proliferator activated receptor nuclear receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **62**:1-13.
 147. ESCHER, P. et WAHLI, W. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat. Res.* **448**:121-138.
 148. HERTZ, R., BERMAN, I., KEPPLER, D., et BAR-TANA, J. (1996) Activation of gene transcription by prostacyclin analogues is mediated by the peroxisome-proliferators-activated receptor (PPAR). *Eur. J. Biochem.* **235**:242-247.
 149. MICHALIK, L. et WAHLI, W. (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotypes for a multitude of functions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**:564-570.
 150. MANO, H., KIMURA, C., FUJISAWA, Y., KAMEDA, T., WATANABE-MANO, M., KANEKO, H., KANEDA, T., HAKEDA, Y., et KUMEGAWA, M. (2000) Cloning and function of rabbit peroxisome proliferator-activated receptor delta/beta in mature osteoclasts. *J. Biol. Chem.* **275**:8126-8132.
 151. FORTIER, I. (2000) Expression des récepteurs aux prostaglandines dans le tissu osseux humain. Mémoire de maîtrise **Université de Sherbrooke**:41-47.
 152. LU, D., YANG, H., SHAW, G., et RAIZADA, M. K. (1998) Angiotensin II-induced nuclear targeting of the angiotensin type 1 (AT1) receptor in brain neurons. *Endocrinology* **139**:365-375.

153. SPENCER, A. G., WOODS, J. W., ARAKAWA, T., SINGER, I. I., et SMITH, W. L. (1998) Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J. Biol. Chem.* **273**:9886-9893.
154. KANAI, N., LU, R., SATRIANO, J. A., BAO, Y., WOLKOFF, A. W., et SCHUSTER, V. L. (1995) Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science* **268**:866-869.
155. BHATTACHARYA, M., PERI, K., RIBEIRO-DA-SILVA, A., ALMAZAN, G., SHICHI, H., HOU, X., VARMA, D. R., et CHEMTOB, S. (1999) Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **274**:15719-15724.
156. BHATTACHARYA, M., PERI, K. G., ALMAZAN, G., RIBEIRO-DA-SILVA, A., SHICHI, H., DUROCHER, Y., ABRAMOVITZ, M., HOU, X., VARMA, D. R., et CHEMTOB, S. (1998) Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:15792-15797.
157. LAKKAKORPI, P. T. et VAANANEN, H. K. (1991) Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro. *J. Bone Miner. Res.* **6**:817-826.
158. ARNETT, T. R. et DEMPSTER, D. W. (1987) A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro: effects of calcitonin and prostaglandins. *Endocrinology* **120**:602-608.
159. CHAMBERS, T. J. et ALI, N. N. (1983) Inhibition of osteoclastic motility by prostaglandins I2, E1, E2 and 6- oxo-E1. *J. Pathol.* **139**:383-397.
160. BANAN, A., SMITH, G. S., KOKOSKA, E. R., et MILLER, T. A. (2000) Role of actin cytoskeleton in prostaglandin-induced protection against ethanol in an intestinal epithelial cell line. *J. Surg. Res.* **88**:104-113.

161. HUGHES-FULFORD, M., APPEL, R., KUMEGAWA, M., et SCHMIDT, J. (1992) Effect of dexamethasone on proliferating osteoblasts: inhibition of prostaglandin E₂ synthesis, DNA synthesis, and alterations in actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **203**:150-156.
162. HASEGAWA, H., NEGISHI, M., KATOH, H., et ICHIKAWA, A. (1997) Two isoforms of prostaglandin EP₃ receptor exhibiting constitutive activity and agonist-dependent activity in Rho-mediated stress fiber formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**:631-636.
163. BUHL, A. M., JOHNSON, N. L., DHANASEKARAN, N., et JOHNSON, G. L. (1995) G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.* **270**:24631-24634.
164. KATO, Y., BANNO, Y., DOHJIMA, T., KATO, N., WATANABE, K., TATEMATSU, N., et NOZAWA, Y. (1997) Involvement of Rho family proteins in prostaglandin F₂ alpha-induced phospholipase D activation in the osteoblast-like cell line MC3T3-E1. *Prostaglandins* **54**:475-492.
165. TAKAHASHI, N., UDAGAWA, N., et SUDA, T. (1999) A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**:449-455.
166. KAJI, H., SUGIMOTO, T., KANATANI, M., FUKASE, M., KUMEGAWA, M., et CHIHARA, K. (1996) Prostaglandin E₂ stimulates osteoclast-like cell formation and bone- resorbing activity via osteoblasts: role of cAMP-dependent protein kinase. *J. Bone Miner. Res.* **11**:62-71.
167. KANEMATSU, M., SATO, T., TAKAI, H., WATANABE, K., IKEDA, K., et YAMADA, Y. (2000) Prostaglandin E₂ induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegrin ligand

on pre-B cells: implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J. Bone Miner. Res.* **15**:1321-1329.

168. VERMA, I. M., STEVENSON, J. K., SCHWARZ, E. M., VAN ANTWERP, D., et MIYAMOTO, S. (1995) Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.* **9**:2723-2735.
169. BAEUERLE, P. A. et BALTIMORE, D. (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**:13-20.